

Tesis de Posgrado

Estudios sobre el sistema de polisacáridos de la semilla de la leguminosa gleditsia triacanthos

Mazzini, María Nélica

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mazzini, María Nélica. (1977). Estudios sobre el sistema de polisacáridos de la semilla de la leguminosa gleditsia triacanthos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1527_Mazzini.pdf

Cita tipo Chicago:

Mazzini, María Nélica. "Estudios sobre el sistema de polisacáridos de la semilla de la leguminosa gleditsia triacanthos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1527_Mazzini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE EL SISTEMA DE POLISACARIDOS

DE LA SEMILLA DE LA

LEGUMINOSA GLEDITSIA TRIACANTHOS

MARIA NELIDA MAZZINI

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

1977

1527

A los míos

Para el Dr. Alberto Cerezo
que propuso el tema de este tra-
bajo — por el acierto de su cons-
tante guía, por la capacidad cien-
tífica y por el valioso estímulo
brindados — mi profunda y afec-
tuosa gratitud

..... que extendiendo a todos los que desinteresadamente facilitaron la conorección de esta tarea:

a la Dra. Blanca B. de Deferrari y a la Lic. Marta Marcote, por los microanálisis realizados;

a las Lic. María Cristina Zaccaro de Mulé y Gloria Zulpa de Caire del Departamento de Biología, por el interés y ayuda en el estudio morfológico de las semillas;

a todos los profesores y compañeros del Departamento de Química Orgánica y a los demás miembros del personal, por la colaboración prestada en una u otra forma.

Mi reconocimiento para el Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, por haberme otorgado una beca de iniciación que me permitió llevar a cabo parte de este estudio.

I N T R O D U C C I O N (°)

En el presente trabajo se aborda un tipo de investigación no usual en el Departamento y que sólo ha sido encarado por laboratorios especializados en los últimos diez años: el estudio de sistemas de polisacáridos.

En general el estudio de polisacáridos ha consistido en el aislamiento de una sustancia, la demostración de su homogeneidad y, hasta donde fuera posible, la determinación de su estructura. Este enfoque, si bien ha sido fructífero dado que en él se basa todo lo que se conoce sobre estos polímeros, resulta extremadamente simplista y como tal adolece de serios defectos.

En el caso de polisacáridos "difíciles de extraer" nunca se tiene la seguridad de que el producto obtenido y sobre el que se llevarán a cabo las determinaciones estructurales, no sea un artefacto producido durante la "extracción" o posterior "purificación". En este sentido es bien conocido que la extracción de algunos polisacáridos involucra la modificación o destrucción de las estructuras de las cuales el mismo formaba parte; un caso extremo se encuentra en la extracción de las hemicelulosas previa deslignificación del material original.

Por otra parte, la obsesión del químico por trabajar con productos "puros" le ha llevado muchas veces a descomponer una sustancia en los intentos de purificarla. Es frecuente encontrar en la literatura citas donde se mencionan los esfuerzos, por ejemplo, para "purificar" un polisacárido de una "contaminación proteica", y que, cuando exitosos, por lo general implicaban la descomposición de una glicoproteína.

Frente a estos hechos y contando con el caudal de conocimientos obtenidos mediante la metodología clásica, la tendencia actual es

(°) En esta introducción, y en función de lo mencionado más adelante, el término polisacárido connota además de su significado específico, el de complejo polisacárido-proteína y/o glicoproteína.

profundizar el estudio de estos polímeros tratando de determinar las estructuras nativas y las interconexiones entre aquellos que se encuentran asociados, es decir, el estudio de los denominados "sistemas de polisacáridos". Dichos sistemas pueden corresponder a conjuntos de polisacáridos relacionados por una estructura básica variante, como en el caso de los carragenanos, o ser asociaciones reales en las cuales los polímeros interaccionan por uniones polares o se encuentran unidos covalentemente; en este último caso se llega al concepto de estructuras. A este respecto merece destacarse que sólo existe un estudio sistemático de una estructura molecular: el de las paredes celulares primarias aisladas de células de Acer pseudoplatanus, realizado por Alber sheim y col. en los primeros años de la presente década.

El tema de este trabajo de Tesis se planteó como una profundización de los conocimientos sobre los polisacáridos componentes de la semilla de la leguminosa Gleditsia triacanthos.

Dado que se tenían antecedentes, a través de los trabajos realizados en este mismo Laboratorio, sobre los productos obtenidos por extracción acuosa, se decidió estudiar los polisacáridos remanentes en el residuo. Si bien no existían referencias inmediatas de trabajos sobre este tipo de semillas se supuso, en base a la experiencia general, que se aislarían sustancias pécticas y hemicelulosas. Cada una de estas clases de polisacáridos se encuentran como mezclas de distintos componentes y usualmente se estudian por separado. Sin embargo no existe una separación neta entre los mismos, ya sea de tipo estructural debido a que los rasgos estructurales secundarios se confunden, o de tipo operativo en razón de que los métodos de extracción pueden ser comunes.

Por este motivo se resolvió considerar al conjunto de productos obtenidos por extracción en medio alcalino del residuo remanente de la extracción acuosa (suma de las posibles sustancias pécticas y hemicelulosas o polisacáridos equivalentes) como un "sistema de polisacáridos" y estudiarlos desde ese punto de vista.

El hecho de que las paredes de las células del endosperma y del embrión fueran primarias hizo innecesario un procedimiento previo de deslignificación con las consiguientes ventajas en lo que respecta al estado nativo del sistema. La extracción en medio alcalino suponía un proceso destructivo como única forma de solubilizar los fragmentos a estudiar. Esta destrucción, cuya magnitud era imposible de prever

ya que se desconocían las características del sistema, fue minimizada tomando las precauciones usuales.

Sobre estas bases se inició el trabajo y los primeros resultados indicaron que: (1) el sistema era mucho más complejo de lo previsto, tanto en composición como en las relaciones entre los componentes, y similar, por lo menos en complejidad, a la estructura descrita para las paredes celulares de Acer pseudoplatanus; (2) se extraían cantidades considerables de proteínas y en consecuencia se presentaba la disyuntiva de purificar el sistema eliminando la "contaminación proteica" con el peligro de producir artefactos, o estudiarlo como tal con las limitaciones que la complejidad impondría. Se eligió la segunda opción con el objeto de obtener conocimientos aunque más limitados, más fieles al sistema original; (3) la degradación producida por el medio alcalino afectaba tanto a los polisacáridos como a las proteínas y producía cantidades considerables de fragmentos de bajo peso molecular. El empleo de la diálisis para la neutralización permitió eliminar la mayor parte de estos fragmentos y estudiar los de mayor tamaño y por lo tanto más representativos; aunque, como contraparte, los rendimientos bajaron drásticamente, afectándose la reproducibilidad de los mismos.

A partir de este punto y teniendo presente este panorama, el estudio del sistema de polisacáridos se enmarcó con todas las técnicas disponibles y a través de la metodología que se describe a lo largo del trabajo. Sin embargo, el no haber podido disponer de una de las herramientas más útiles en este tipo de estudios, esto es la aplicación combinada de la cromatografía gaseosa y la espectrometría de masas, sin la cual es imposible intentar los estudios de metilación de mezclas extremadamente complejas de azúcares parcialmente metilados como las que se producen en estos sistemas, determinó que parte del trabajo resultara incompleto y que muchas de las deducciones no hayan podido ser confirmadas.

Como balance, puede afirmarse que los resultados, si bien están limitados por la complejidad del problema, son altamente positivos ya que permiten formarse una idea bastante amplia y detallada de un sistema de polisacáridos no estudiado hasta el momento.

ya que se desconocían las características del sistema, fue minimizada tomando las precauciones usuales.

Sobre estas bases se inició el trabajo y los primeros resultados indicaron que: (1) el sistema era mucho más complejo de lo previsto, tanto en composición como en las relaciones entre los componentes, y similar, por lo menos en complejidad, a la estructura descrita para las paredes celulares de Acer pseudoplatanus; (2) se extraían cantidades considerables de proteínas y en consecuencia se presentaba la disyuntiva de purificar el sistema eliminando la "contaminación proteica" con el peligro de producir artefactos, o estudiarlo como tal con las limitaciones que la complejidad impondría. Se eligió la segunda opción con el objeto de obtener conocimientos aunque más limitados, más fieles al sistema original; (3) la degradación producida por el medio alcalino afectaba tanto a los polisacáridos como a las proteínas y producía cantidades considerables de fragmentos de bajo peso molecular. El empleo de la diálisis para la neutralización permitió eliminar la mayor parte de estos fragmentos y estudiar los de mayor tamaño y por lo tanto más representativos; aunque, como contraparte, los rendimientos bajaron drásticamente, afectándose la reproducibilidad de los mismos.

A partir de este punto y teniendo presente este panorama, el estudio del sistema de polisacáridos se enmarcó con todas las técnicas disponibles y a través de la metodología que se describe a lo largo del trabajo. Sin embargo, el no haber podido disponer de una de las herramientas más útiles en este tipo de estudios, esto es la aplicación combinada de la cromatografía gaseosa y la espectrometría de masas, sin la cual es imposible intentar los estudios de metilación de mezclas extremadamente complejas de azúcares parcialmente metilados como las que se producen en estos sistemas, determinó que parte del trabajo resultara incompleto y que muchas de las deducciones no hayan podido ser confirmadas.

Como balance, puede afirmarse que los resultados, si bien están limitados por la complejidad del problema, son altamente positivos ya que permiten formarse una idea bastante amplia y detallada de un sistema de polisacáridos no estudiado hasta el momento.

I N D I C E

<u>INTRODUCCION BOTANICA</u>	1
 <u>POLISACARIDOS DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS</u>	
Generalidades	4
Polisacáridos de reserva	4
Almidón	4
Galactomananos	4
Amiloides	6
Otros mucílagos solubles	6
Polisacáridos estructurales	7
Sustancias pépticas	7
Hemicelulosas	8
Celulosa	10
Estudios realizados en la Argentina sobre especies productoras de gomas y mucílagos de semillas (galactomananos)	10
Estudios realizados sobre los polisacáridos de semillas de <u>Gleditsia triacanthos</u>	12
 <u>PROTEINAS DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS</u>	
Proteínas de reserva	15
Proteínas estructurales	17
 <u>GLICOPROTEINAS DE VEGETALES SUPERIORES</u>	
Introducción	21
Glicoproteínas de paredes celulares	21
Glicoproteínas que no pertenecen a las paredes celulares	23
Naturaleza del enlace hidrato de carbono-proteína	27
 <u>PAREDES CELULARES DE VEGETALES SUPERIORES: COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA</u>	
Introducción	30
Composición química	31
Estructura molecular	33
Determinación de la estructura molecular de las paredes celulares primarias	35
 <u>EXTRACCION DE LOS POLISACARIDOS</u>	
Generalidades	43
Extracción alcalina	44
Modificaciones químicas producidas durante la extracción	47
Efectos de la extracción en medio alcalino	48

DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Estudio de las semillas	51
Morfología interna	51
Composición en aminoácidos	53
Galactomananos	53
Hemicelulosas	59
Sustancias pécticas	62
Extracciones cruzadas	63
Polisacáridos solubles en solución de urea 7 M	63
Hemicelulosa A	64
Propiedades generales	64
Fraccionamiento. Propiedades de las fracciones	66
Hidrólisis ácida parcial	70
Oxidación con periodato	73
Hemicelulosa B	78
Propiedades generales	78
Fraccionamiento. Propiedades de las fracciones	80
Hemicelulosa C	83
Propiedades generales	83
Hidrólisis ácida total	84
Hidrólisis enzimática	86
Determinaciones de homogeneidad	88
Fraccionamiento. Propiedades de las fracciones	88
Unión polisacárido-proteína. Determinación de las uniones O-glicosídicas a serina y/o treonina	98

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Polisacáridos solubles en agua (Galactomananos)	101
Polisacáridos insolubles en agua	106
Hemicelulosas	109
Sustancias pécticas	112
Hemicelulosa A	119
Hemicelulosa B	128
Hemicelulosa C	135
Naturaleza del enlace polisacárido-proteína	143
Conclusión	146

PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas generales	150
Métodos cromatográficos	152
Cromatografía sobre papel y placa delgada	152
Cromatografía gaseosa	154
Cromatografía sobre geles	162
Métodos electroforéticos	164
Electroforesis sobre papel	164
Electroforesis sobre acetato de celulosa	165
Electroforesis sobre gel de poliacrilamida	165
Métodos de diálisis	166
Métodos de hidrólisis ácida	167
Hidrólisis ácida total	167
Hidrólisis ácida parcial	168
Métodos de oxidación con periodato	169
Técnica general	169

Determinación del consumo de periodato	169
Determinación del ácido fórmico producido	171
Determinación del grado de polimerización	172
Determinación cuantitativa de los azúcares componentes	173
Azúcares totales	173
Ácidos urónicos	176
Ácidos urónicos y hexosas	177
Identificación del ácido urónico	179
Pentosas y hexosas	181
Ácido siálico	183
Determinación cuantitativa de las proteínas totales	185
Determinación cuantitativa de los aminoácidos componentes	185
Hidrólisis de las proteínas y purificación del hidrolizado	186
Dosaje con el analizador automático	187
Hidroxiprolina	189
Hidroxilisina	191
Tirosina y triptofano	192
Determinación del contenido en lignina	195
Determinación del contenido en lípidos	196
Características del material	197
Extracción y purificación de las fracciones	198
Nomenclatura	198
Galactomananos	198
Hemicelulosas	202
Sustancias pécticas	207
Extracciones cruzadas	208
Polisacáridos solubles en solución de urea 7 M	209
Oxidación con periodato de la fracción HA	209
Oxidación con periodato de la fracción HA degradada insoluble por hidrólisis ácida parcial (fracción a)	209
Determinación de las uniones O-glicosídicas a serina y/o treonina en la fracción HC	210

APENDICE

Estudios de diálisis	212
Discusión sobre los métodos utilizados en la identificación y valoración de los azúcares por cromatografía gas-líquido	217

RESUMEN

225

BIBLIOGRAFIA

228

I N D I C E D E F I G U R A S

Nº	Pág.	Nº	Pág.	Nº	Pág.	Nº	Pág.
1	3	21	65	41	91	61	182
2	3	22	66	42	91	62	184
3	27	23	68	43	92	63	184
4	28	24	69	44	92	64	186
5	28	25	70	45	93	65	189
6	29	26	73	46	94	66	190
7	30	27	74	47	94	67	192
8	34	28	76	48	95	68	194
9	36	29	77	49	95	69	195
10	38	30	78	50	96	70	213
11	40	31	79	51	97	71	213
12	49	32	79	52	97	72	214
13	49	33	82	53	98	73	214
14	52	34	85	54	99	74	215
15	54	35	87	55	161	75	216
16	54	36	88	56	170	76	219
17	55	37	89	57	174	77	219
18	56	38	89	58	175	78	221
19	57	39	90	59	176	79	224
20	64	40	90	60	178		

I N D I C E D E T A B L A S

Nº	Pág.	Nº	Pág.	Nº	Pág.	Nº	Pág.
1	2	18	36	35	71	52	139
2	5	19	51	36	72	53	148
3	7	20	53	37	73	54	158
4	10	21	53	38	75	55	159
5	12	22	54	39	75	56	162
6	13	23	57	40	81	57	177
7	16	24	58	41	81	58	181
8	16	25	60	42	82	59	188
9	17	26	60	43	82	60	195
10	17	27	61	44	83	61	195
11	18	28	61	45	84	62	197
12	18	29	63	46	86	63	198
13	19	30	63	47	87	64	212
14	20	31	67	48	87	65	215
15	23	32	67	49	96	66	221
16	24	33	68	50	112		
17	32	34	69	51	112		

I N T R O D U C C I O N B O T A N I C A

Los vegetales superiores o Fanerógamas se dividen en Angiospermas y Gimnospermas.

Las Angiospermas comprenden dos clases: las Monocotiledóneas y las Dicotiledóneas, según posean plántula con uno o dos cotiledones, respectivamente.

Dentro de las Monocotiledóneas, la familia de las Gramíneas ha sido la más estudiada desde el punto de vista químico debido a su importancia económica, especialmente en lo que hace a la composición de las semillas.

Entre las Dicotiledóneas, en el orden de las Rosales, encontramos la familia más importante de las Angiospermas: las Leguminosas. Desde el punto de vista económico suministra una gran variedad de productos para la alimentación, principalmente de semillas, aplicaciones de tipo industrial y medicinal, y para forraje y forestación. Desde el punto de vista botánico y taxonómico se destaca por el elevado número de especies que presenta y las características de las mismas.

La Tabla 1 hace referencia a las leguminosas económicamente importantes, la mayoría de las cuales, espontáneas o cultivadas, se aprovechan en la Argentina. Es interesante destacar como muchas leguminosas, entre ellas la Gleditsia triacanthos, presentan varias utilidades.

A las Leguminosas, subfamilia de las Cesalpinioideas, pertenece el género Gleditsia (Burkart, 1952). Comprende más de quince especies de árboles dioicos o polígamo dioicos, de flores pequeñas, con hojas pinadas y bipinadas a la vez. Su amplia distribución mundial es indicativa de una gran antigüedad geológica.

La Gleditsia triacanthos, originaria de la parte este de los Estados Unidos, se ha difundido en la Argentina principalmente en la zona agrícola y ganadera de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. Es cadufo-
folia, de rápido crecimiento, muy resistente al frío y rústica en cuanto al suelo y a la sequía. Se la conoce como "acacia negra". Se presta para arbolar calles, formar cercos y montes de abrigo y da madera de grano grueso, resistente, muy durable en contacto con el suelo y por lo tanto usada para postes de alambrado, ruedas, rieles y en construcciones. Las espinas, ramificadas y poderosas (Figura 1), son un inconveniente para el uso, salvo en el caso de cercos vivos. En lugares favorables (Buenos Aires, Córdoba), la Gleditsia triacanthos se reproduce en abundancia por semillas.

Las vainas maduras (Figura 1), de 20 a 40 cm. de longitud, negras y algo retorcidas, son un forraje auxiliar (la pulpa contiene un 25 % de azúcares). En el oeste de Córdoba crece y fructifica muy bien.

Tabla 1. Leguminosas de importancia económica.

I. LEGUMINOSAS ALIMENTICIAS

<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Dolichos lablab</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>
<i>Cajanus indicus</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Lens culinaris</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Ceratonia siliqua</i>	<i>Phaseolus aureus</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Vigna unguiculata</i>

II. LEGUMINOSAS FORRAJERAS Y DE ABONO VERDE

<i>Anthyllis vulneraria</i>	<i>Lespedeza striata</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Trifolium repens</i>
<i>Lathyrus sativus</i>	<i>Melilotus alba</i>	<i>Trifolium subterraneum</i>
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>Tetragonolobus purpureus</i>
<i>Lupinus luteus</i>	<i>Pisum arvense</i>	<i>Vicia sativa</i>

III. LEGUMINOSAS INDUSTRIALES

A) Leguminosas tánicas y tintóreas

<i>Acacia catechu</i>	<i>Acacia pycnantha</i>	<i>Haematoxylon campechianum</i>
<i>Acacia mearnsii</i>	<i>Baphia nitida</i>	<i>Indigofera tinctoria</i>
<i>Acacia dealbata</i>	<i>Genista tinctoria</i>	

B) Leguminosas oleaginosas y leguminosas usadas en perfumería

<i>Acacia farnesiana</i>	<i>Dypterix odorata</i>	<i>Tamarindus indica</i>
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Trigonella foenum-graecum</i>

C) Leguminosas productoras de mucílagos y resinas

<i>Acacia senegal</i>	<i>Daniella ogea</i>	<i>Hymenaea courbaril</i>
<i>Astragalus gummiifer</i>	<i>Gleditsia amorphoides</i>	<i>Myroxylon balsamum</i>
<i>Copaifera demusei</i>	<i>Gleditsia triacanthos</i>	

IV. LEGUMINOSAS MEDICINALES

<i>Cassia acutifolia</i>	<i>Coronilla emerus</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
<i>Cassia angustifolia</i>	<i>Galega officinalis</i>	<i>Ononis spinosa</i>

V. LEGUMINOSAS FORESTALES

<i>Acacia melanoxylon</i>	<i>Gleditsia amorphoides</i>	<i>Pterocarpus santalinus</i>
<i>Albizia lebbek</i>	<i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>Robinia pseudacacia</i>
<i>Dalbergia latifolia</i>	<i>Hymenaea courbaril</i>	<i>Sophora tetraptera</i>
<i>Dalbergia nigra</i>	<i>Pericopsis mooniana</i>	

VI. LEGUMINOSAS ORNAMENTALES

<i>Acacia dealbata</i>	<i>Erythrina crista-galli</i>	<i>Lupinus polyphyllus</i>
<i>Cercis siliquastrum</i>	<i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>Mimosa pudica</i>
<i>Colutea arborescens</i>	<i>Laburnum angyroides</i>	<i>Sophora japonica</i>
<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Lathyrus odoratus</i>	<i>Wisteria chinensis</i>

VII. LEGUMINOSAS INSECTICIDAS

<i>Derris elliptica</i>	<i>Pachyrrhizus erosus</i>	<i>Piscidia erythrina</i>
<i>Lonchocarpus nicou</i>		

El tronco excreta una goma parecida a la arábica, que forma lágrimas doradas al solidificarse.

Las semillas contienen albumen, cotiledones rectos al corte (Figura 2), y son comprimidas lateralmente. Las caras laterales no presentan manchas ni depresiones elípticas. La longitud de la semilla está

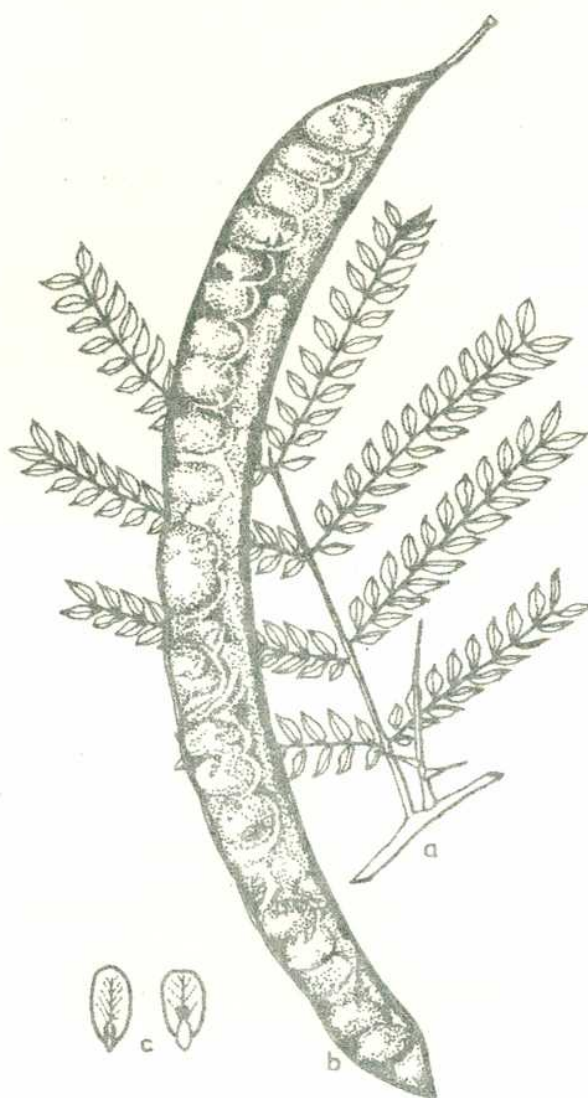


Figura 1. Glodisia triacanthos. a, raíz; b, vaina madra (x 0,5); c, embrión.

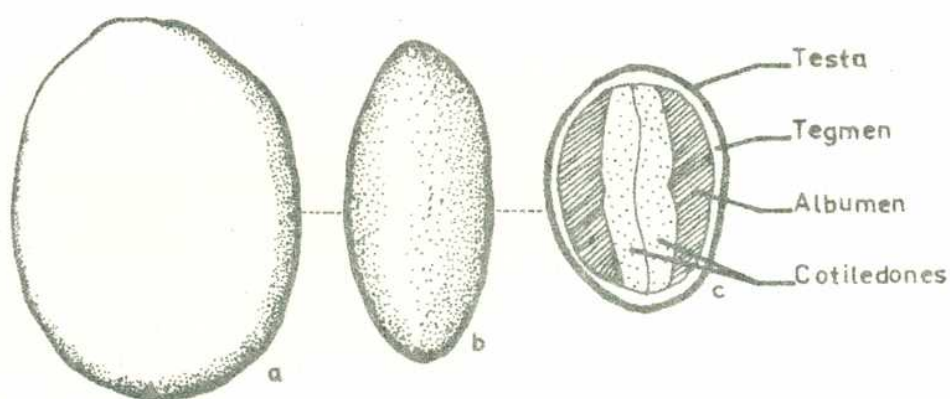


Figura 2. Semillas de Glodisia triacanthos. a, perfil (x 5); b, frente (x 4); c, corte transversal (x 5).

comprendida entre los 7 y 15 mm. Son de color canela, de grosor de 3,0 a 4,5 mm., de forma regular, con el punto más grueso en el medio de las semillas, afinándose simétricamente hacia ambos extremos.

POLISACÁRIDOS DE SEMILLAS
DE
LEGUMINOSAS

GENERALIDADES

El estudio de los polisacáridos de semillas de leguminosas ha alcanzado importancia debido, fundamentalmente, a las numerosas aplicaciones de tipo industrial conocidas hasta el momento. La familia de las leguminosas parece ser la mejor fuente de gomas y mucílagos de semillas.

Los polisacáridos pueden ser clasificados según su función dentro de la semilla, en:

- polisacáridos de reserva
- polisacáridos estructurales

Es importante notar que, debido a la gran variedad de métodos de análisis y el vocabulario empleado por los investigadores en este campo, existen diferencias de definición de las distintas clases de polisacáridos y dificultades en la comparación de los resultados. Además, los materiales de por sí, no pueden ser sujetos a una rígida clasificación en razón de la complejidad de las estructuras que presentan.

POLISACÁRIDOS DE RESERVA
ALMIDÓN

La presencia de almidón ha sido más investigada en semillas de leguminosas como porotos y arvejas. Sin embargo, se ha encontrado (Kooiman, 1960a) que semillas pertenecientes a distintos géneros carecen, aparentemente, de almidón.

Por otra parte, Tookey y Jones (1965) establecieron que todas las semillas de las 173 especies que son fuentes de galactomananos, están libres de almidón.

GALACTOMANANOS

Son polisacáridos mucilaginosos que forman geles en presencia de agua y que se encuentran en el endosperma de las semillas. Desaparecen durante la germinación y presumiblemente sirvan como polisacáridos de reserva (Mc Cleary y Matheson, 1976). Por otra parte, debido al carácter mucilaginoso del endosperma, otra función sería la de volverse gelatinoso y facilitar la salida del embrión durante la germinación.

Se extraen fácilmente con agua de semillas molidas para dar una solución de viscosidad variable. Debido a su valor económico potencial, los polisacáridos del endosperma de numerosas leguminosas han sido ampliamente investigados (Tabla 2).

Están compuestos por D-manosa y D-galactosa solamente, y consisten en cadenas de unidades de D-manosa enlazadas por uniones β -(1-4)-

Tabla 2. Galactomananos de semillas de leguminosas.^a

Especies	Relación Man: Gal	Especies	Relación Man: Gal
<i>Cassia emarginata</i>	2,7	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	1,8
<i>C. fistula</i>	3,3	<i>Indigofera hirsuta</i>	3,1
<i>C. leptocarpa</i>	3,1	<i>Sesbania grandiflora</i>	2,0
<i>C. marylandica</i>	3,8	<i>Astragalus cicer</i>	1,3
<i>Ceratonia siliqua</i>	4,0	<i>A. glycyphyllos</i>	1,2
<i>Caesalpinia cocalaco</i>	2,5	<i>A. nuttallianus</i>	1,4
<i>C. pulcherrima</i>	1,9	<i>A. sinicus</i>	1,6
<i>C. spinosa</i>	2,7	<i>A. tenellus</i>	1,2
<i>Cercidium torreyanum</i>	3,3	<i>Glycine max.</i>	1,5 ^d
<i>Delonix regia</i>	4,2	<i>G. max.</i>	1,4 ^e
<i>Gleditsia amorphoides</i>	2,3	<i>G. max.</i>	2,3 ^e
<i>G. ferox</i>	3,8	<i>Medicago hispida</i>	1,2
<i>G. triacanthos</i>	2,7 ^b	<i>M. lupulina</i>	1,1
<i>G. triacanthos</i>	3,3 ^c	<i>M. orbicularis</i>	1,6
<i>Gymnocladus dioica</i>	2,7	<i>M. sativa</i>	1,1
<i>Parkinsonia aculeata</i>	2,7	<i>Melilotus indica</i>	1,0
<i>Desmanthus illinoensis</i>	2,7	<i>Trifolium hirtum</i>	1,0
<i>Leucaena glauca</i>	1,3	<i>T. pratense</i>	1,3
<i>Sophora japonica</i>	5,1	<i>T. resupinatum</i>	1,8
<i>Crotalaria incana</i>	2,7	<i>T. repens</i>	1,3
<i>C. intermedia</i>	2,3	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	1,2
<i>C. lanceolata</i>	2,6	<i>Anthyllis vulneria</i>	1,3
<i>C. mucronata</i>	2,9	<i>Lotus corniculatus</i>	1,3
<i>C. retusa</i>	2,8	<i>L. pedunculatus</i>	1,0
<i>C. spectabilis</i>	2,8	<i>L. scoparius</i>	1,1

^a Bailey (1971).^b Anderson (1949).^c Leschiner y Carazo (1970).^d Whistler y Searles (1957).^e Aspinall y Whyte (1954).

con ramificaciones de D-galactosa en posición α -(1→6)- a lo largo de la cadena. Este tipo de galactomananos parece estar restringido a las semillas de leguminosas, con la única excepción de las semillas de *Ipomoea muricata* (Khanna y Gupta, 1967), que presenta un mucílago (galactosa, 35%; manosa, 65%) de estructura similar a los de las leguminosas.

El interés taxonómico de los mismos radica en que la cantidad de polímero y la proporción de galactosa y manosa, varían con la especie. Las especies de la subfamilia de las Caesalpinioideae contienen los mayores niveles de galactomananos (25 a 35% de la semilla seca, Tookey y Jones, 1965), mientras que la composición en galactosa es, por lo general, bajo (20 a 25% del galactomanano). En contraste, las de las Lotoideae presentan de un 5 a 25% de galactomananos y la composición en ga-

tosa puede llegar hasta un 49% del galactomanano.

AMILLOIDES

La denominación de amiloide fue asignada al polisacárido extraído con agua caliente de las semillas de Tamarindus indica (Leguminosa) que daba color azul con iodo (Vogel y Schleiden, 1839). Este polisacárido se encuentra en gran cantidad (40 a 50% de la semilla descortezada) en las paredes celulares gruesas de los cotiledones y actúa, posiblemente, como polisacárido de reserva. Los estudios efectuados sobre su estructura (Kooiman, 1961) indicaron que este amiloide contiene D-glucosa, D-xilosa y D-galactosa en una relación molar de 4,0:3,0:1,3 y una estructura ramificada basada en una cadena lineal de glucosa unida β -(1→4)-, con ramificaciones de xilosa en posición α -(1→6)- entre tres de cada cuatro unidades de glucosa, y de galactosa unidas β -(1→2)- a algunas de esas unidades de xilosa.

Kooiman (1960 a,b) empleó la reacción con iodo-ioduro de potasio como ensayo para detectar la presencia de amiloides y junto con la extracción alcalina, como determinación cuantitativa de los mismos. La mayoría de las reacciones positivas se observaron entre las Brachystegioidae y las Caesalpinioideae, aunque un grupo de estas últimas, entre las que se encuentra la Gleditsia triacanthos, no contienen amiloides.

OTROS MUCILAGOS SOLUBLES

Entre los polisacáridos solubles, a menudo mucilaginosos, extraídos de semillas de leguminosas, figuran los de Anagyris foetida (Condorelli y Chindemi, 1928) y los de Centrosema plumeri (Unrau, 1964) que son arabinogalactanos, formados en este último caso por un 92% de D-galactosa y un 7% de L-arabinosa, y con uniones β -(1→4)- principalmente.

Arabinogalactanos similares se aislaron de cotiledones de soya (Aspinall y col., 1967a; Narasaki y Fujimoto, 1965) con una cadena principal de β -(1→4)-D-galactopiranososa y ramificaciones en C-3 de disacáridos de L-arabinosa cada 4 ó 5 unidades. Es importante notar que la estrecha similitud observada con los arabinogalactanos y galactanos de las sustancias pécticas (ver Polisacáridos estructurales) es un índice más respecto de la falta de definición entre ambos grupos.

También se han extraído mucílagos compuestos de D-xilosa y ácido D-glucurónico (5:1) y de L-arabinosa y D-glucosa (3:7) de Mimosa pudica (Hulyalkar y col., 1957) y de Cicer Arietinum (El Hanafy y Taha, 1963).

Mucílagos más complejos compuestos de cantidades variables de D-galactosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, L-ramnosa y ácido urónico, se aislaron de semillas de Samanea saman (Morimoto y col., 1962), de

Pongamia glabra (Sinha, 1960 a), de Phaseolus glaber (Sinha, 1960 b) y de Phaseolus mungo (Kadkol y col., 1962). Este último se extrajo con buffer de acetato pH 4,6 y resultó inusual ya que contiene un 20% de proteína junto con D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y ácido galacturónico en una relación molar de 13:18:3:2.

POLISACARIDOS ESTRUCTURALES

Son los polisacáridos de las paredes celulares y generalmente se los agrupa de la siguiente manera:

SUSTANCIAS PECTICAS

Comprenden una mezcla compleja de polisacáridos acídicos y neutros que son extraídos con solución de oxalato en caliente, o con agentes quelantes como el EDTA. Comprenden tres tipos de polisacáridos:

Pectinas

Si bien están basadas en una cadena lineal de ácido D-galacturónico unido α -(1→4)-, la mayoría contiene otros azúcares presentes, tanto como cadenas laterales como en la cadena principal (Aspinall y col., 1968), entre los que la L-ramnosa es el constituyente más generalizado (Aspinall y col., 1966, 1967 a, b y c). Las pectinas de semillas suelen ser estructuralmente más complejas que las de hojas y tallos.

La Tabla 3 muestra un resumen de los estudios estructurales llevados a cabo sobre las pectinas de vainas, cotiledones e hipocotiledones de Glycine max.

Tabla 3. Fracciones pécicas de semillas de Glycine max.^a

Tejido	Acido galacturónico (%)	Monosacáridos neutros ^b
Vainas	70	D-Gal ^c , L-Ara ^c , D-Xil, L-Fuc, L-Ram ^c (2:1:1:2:1)
Cotiledones	ND	D-Gal, L-Ara ^c , D-Xil ^c , L-Fuc, L-Ram ^c
Hipocotiledones	ND	D-Gal, D-Xil, L-Ara

^a Aspinall y col., 1966, 1967 a, b y c.

^b En ésta y las subsiguientes Tablas las abreviaturas significan: Ara = arabinosa, Fuc = fucosa, Ram = ramnosa, Xil = xilosa, Man = manosa, Gal = galactosa, Glu = glucosa, GalA = ácido galacturónico, GluA = ácido glucourónico, GluN = glucosamina, ND = no determinado, Tr = trazas.

^c Monosacáridos presentes en la cadena principal de ácido D-galacturónico.

Arabanos

Son polímeros formados por L-arabinofurana unida α -(1→5)-, con ramificaciones en O-3 y en algunos casos en O-2. Se extraen, por lo general, junto con las otras sustancias pécicas, particularmente en el caso de las semillas. Pueden ser divididos en dos grandes grupos (Siddiqui y Wood, 1974): el primero incluye los arabanos asociados con

pectinas y son obtenidos, probablemente, por degradación alcalina durante los procedimientos de aislación y fraccionamiento; el segundo consiste en homoglicanos naturales.

Hirst y Jones (1939, 1947) aislaron arabanos puros de Arachis hypogaea debido a que, en estas semillas, se encuentra asociado con muy poco galactano y puede ser fácilmente separado de la pectina. También han sido aislados arabanos de la harina de soya (Narasaki y Fujimoto, 1965) y de Brassica alba (Rees y Richardson, 1966).

Las pequeñas cantidades de arabinosa encontradas en los hidrolizados de pectinas también pueden deberse a arabinosa presente en la molécula de poliurónico o a un arabinogalactano (ver a continuación).

Galactanos

De semillas de Lupinus albus, Hirst y col. (1947) aislaron un galactano compuesto solamente por D-galactosa unida β -(1 \rightarrow 4)-. Esta semilla en particular posee un bajo nivel de pectinas y arabanos, y por lo tanto el galactano pudo ser fácilmente purificado. El galactano aislado de Strychnos mix-vomica (Andrews y col., 1954) tiene una estructura similar y posee ramificaciones en O-3 y en O-6.

Estos galactanos puros representan casos especiales. La D-galactosa comunmente encontrada en los hidrolizados de sustancias pécticas, puede ser de arabinogalactanos y de polisacáridos ácidos complejos (pectinas) del tipo aislados de la harina de soya por Aspinall y col. (1967 a,b) y por Narasaki y Fujimoto (1965). En este sentido caben mencionar las sustancias pécticas extraídas por Tadros y Kamel (1952) de Lupinus termis, que contienen D-galactosa, L-arabinosa y ácido D-galacturónico, pero que no son separables en un arabano y un galactano.

HEMICELULOSAS

El término hemicelulosa fue propuesto por Schulze (1891) para designar aquellos polisacáridos extraíbles de plantas con álcali diluido, pero no con agua. El término resultó en los comienzos adecuado, puesto que esos polisacáridos se encontraron en estrecha asociación con la celulosa en las paredes celulares, y se creyó que eran intermediarios en la biosíntesis de la celulosa. Actualmente se sabe que las hemicelulosas no son precursores de la celulosa y que no están vinculados con la biosíntesis de la misma, sino que por lo contrario constituyen un grupo aparte dentro de los polisacáridos de los vegetales.

La mayoría de los investigadores usan el término para designar a los polisacáridos de paredes celulares, excepto las sustancias pécticas y las celulosas, y los clasifican de acuerdo con el tipo de azúcar presente y sus principales características químicas, y también en función de su solubilidad. Así en general los polisacáridos constituidos

por pentosas se extraen con álcali diluido (5 a 10%) y se precipitan por acidificación a pH 4,5 a 5,0 para dar la que, en el procedimiento convencional establecido originariamente por O'Dwyer (1926), se denomina hemicelulosa A. Esta fracción, purificada por sucesivas reprecipitaciones de sus soluciones alcalinas, es por lo general homogénea y está formada por polisacáridos lineales. Los polisacáridos de pentosas más solubles y los polisacáridos de hexosas extraídos permanecen en solución en el medio ácido y son designados como hemicelulosa B. Esta fracción es una mezcla de varios polímeros diferentes, tanto lineales como ramificados. La hemicelulosa C es la fracción que permanece en solución luego de llevar a cabo la aislación de la hemicelulosa B por precipitación con tres volúmenes de etanol. Esta fracción generalmente es descartada debido a la dificultad de remover las sales (acetato de sodio) producidas en la neutralización. Blake y Richards (1970) indicaron que esta fracción consiste en productos de degradación derivados de la lignina, pero también posiblemente de la degradación alcalina oxidativa de los polisacáridos (ver Efectos de la extracción en medio alcalino, pág. 48), y de un alto contenido en cenizas.

Desde el punto de vista de la composición, los homoglicanos no se encuentran en proporciones considerables. La mayoría de las hemicelulosas son heteroglicanos que contienen de dos a cuatro, y raramente de cinco a seis diferentes tipos de monosacáridos. Los heteroglicanos comunmente encontrados son L-arabino-D-xilanos, L-arabino-D-glucurono-D-xilanos, 4-O-metil-D-glucurono-D-xilanos, L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilanos, D-glucó-D-mananos, D-galacto-D-glucó-D-mananos y L-arabino-D-galactanos. Las hemicelulosas tienen usualmente estructuras ramificadas y las moléculas están, a veces, parcialmente acetiladas. Muchos de los heteroglicanos requieren para su aislamiento álcali más concentrado (24%) y también la presencia de borato (4%), ya que es difícil disolverlos fuera de la celulosa.

El interés del estudio estructural de estos polisacáridos en las semillas de las leguminosas deriva, fundamentalmente, de la importancia agrícola de las mismas, y en tal sentido han sido estudiados la composición en monosacáridos de las paredes celulares y su variación durante el desarrollo, en plantas forrajeras: alfalfa (Medicago sativa) y tréboles (Trifolium repens y T. pratense) (Hirst y col., 1959), porotos (Phaseolus y Vicia), guisantes (Pisum) y soya (Glycine max) (Nevins y col., 1967). Se han estudiado, asimismo, las distintas fracciones en cuanto a su composición y/o estructura. Las fracciones convencionales de hemicelulosas A y B son las preparadas generalmente, pero en muchos casos se examinaron solamente las fracciones purificadas a partir de

las mismas, que representan sólo una parte del total de las respectivas hemicelulosas.

Los estudios llevados a cabo en semillas de leguminosas están generalizados en la Tabla 4.

En comparación con los datos obtenidos de otras partes de los vegetales (tallos y hojas) es de notar que, si bien los polisacáridos de semillas contienen el glucuronoxilano, los pentosanos libres de ácidos urónicos y posiblemente los galactoglucomananos que caracterizan a las hemicelulosas de otras partes, presentan también un mayor número de polisacáridos más complejos, varios de los cuales contienen cantidades significativas de L-fucosa.

CELULOSA

Forma las microfibrillas organizadas de las paredes celulares.

Tabla 4. Hemicelulosas de semillas de leguminosas.^a

Especie y tejido	Polímero	Monosacáridos	Estructura
<u>Arachis hypogaea</u> Vainas	Hemicelulosa A	D-Xil, D-GluA	Cadena de β -(1→4)- D-Xil, ramificaciones 0-2 de urón.
	Hemicelulosa B	D-Xil, L-Ara, D-GluA	Unidades de GluA-Ara sobre la cadena de β -(1→4) D-Xil.
	Hemicelulosa B ₂	D-Xil, L-Ara, L-Ram, D-Gal, D-GluA	Altamente ramificada
<u>Pisum sativum</u> Testa	Arabinoxilano A	D-Xil, L-Ara (1:5)	Cadena de β -(1→4)- D-Xil, ramificaciones 0-3 de L-Ara
	Arabinoxilano B	D-Xil, L-Ara (1:18)	Cadena de β -(1→4)- D-Xil, ramificaciones 0-3 de L-Ara
<u>Glycine max</u> Vainas	Hemicelulosa A (xilano)	D-Xil, D-GluA (95:3-4%)	Cadena de β -(1→4)- D-Xil, ramificaciones 0-2 de GluA
	Hemicelulosa B	D-Xil, L-Ara, D-Gal, D-Glu, 4-O-Me-D-GluA	Altamente ramificada
	Galactoglucomanano	D-Man, D-Gal, D-Glu (23:2:1)	Cadena de β -(1→4)- D-Man
Harina	Soluble en alc. 5%	D-Xil, L-Ara, D-Glu, D-Gal, L-Fuc, L-Ram, D-GluA	
<u>Vicia faba</u> Harina	Hemicelulosa B	D-Xil, L-Ara, D-Glu, L-Ram, L-Fuc, D-Gal, D-GluA	
<u>Lupinus luteus</u> Harina		D-Gal, L-Ara, D-GalA, D-Xil, L-Ram (15:10:6:2:2) y (6:4:3:1:1)	

^a Bailey (1971).

ESTUDIOS REALIZADOS EN LA ARGENTINA
SOBRE ESPECIES PRODUCTORAS DE GOMAS
Y MUCILAGOS DE SEMILLAS (GALACTOMANANOS)

Con el objeto de encontrar una sustancia natural indígena capaz de reemplazar, total o parcialmente, las aplicaciones de los aglutinantes importados necesarios para ciertas industrias de las ramas textil, alimenticia, de cosméticos, etc., y como aditivos en la industria del

papel, se buscó en nuestro país (Riqué y Pardo, 1954; Riqué, 1960) un sucedáneo de las gomas y mucílagos de semillas de "algarrobo europeo" (Ceratonia siliqua).

Los estudios sobre este tipo de gomas se iniciaron con semillas de Gleditsia amorphoides (Riqué y Pardo, 1954), ya que desde el punto de vista botánico y dentro de la clasificación sistemática natural, aparece como una de las especies forestales de nuestro país más cercanas y afines al "algarrobo europeo".

Cabe señalar que del género Gleditsia existen en nuestro país dos especies: la G. amorphoides conocida como "espiná corona" y la G. triacanthos antes descripta (ver Introducción botánica, pág. 1). La primera es una especie indígena que crece espontáneamente en los bosques y selvas del norte del país (Salta, Jujuy, Chaco, Formosa, Corrientes y norte de Entre Ríos). Los árboles de ambas especies son semejantes en su aspecto general, pero pueden diferenciarse con facilidad principalmente por el tamaño de sus frutos (de 6 a 8 cm y de 20 a 40 cm, respectivamente).

La composición química de las semillas de Gleditsia amorphoides (Riqué y Pardo, 1954) es semejante a las de Ceratonia siliqua, y el comportamiento de la goma contenida en las semillas (Riqué y Pardo, 1954; Riqué, 1960) resultó adecuado como para justificar un campo altamente promisorio para sus aplicaciones industriales.

La estructura del galactomanano contenido en la semilla, fue estudiada por Cerezo (1965). Por extracción con agua caliente se obtuvo, con un rendimiento del 30%, un galactomanano homogéneo compuesto de un 28,6% de D-galactosa y un 71,4% de D-manosa. Los análisis por oxidación con periodato indicaron que todas las unidades de manosa y galactosa resultaron atacadas, ya que por reducción del oxopolisacárido y posterior hidrólisis sólo se obtuvo glicerol y eritritol (1,0: 2,7). El consumo de periodato fue de 4,8 moles cada 4 unidades de hexosa, con producción de un mol de ácido fórmico. Por hidrólisis del polisacárido metilado se determinó 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactosa (1 mol), 2,3,6-tri-O-metil-D-manosa (2,1 moles) y 2,3-di-O-metil-D-manosa (1,1 moles). A partir de estos resultados y por analogía con las estructuras propuestas para otros galactomananos (Smith y Montgomery, 1959), se postuló para el galactomanano de Gleditsia amorphoides una estructura consistente en una cadena lineal de β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranosá sustituida en O-6 (una cada tres unidades) por D-galactopiranosá con enlaces α . Esta estructura es similar a la del galactomanano del "algarrobo europeo".

Los estudios efectuados sobre las semillas de Gleditsia triacan-

thos figuran a continuación.

ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE LOS POLI-SACARIDOS DE SEMILLAS DE GLEDITSIA TRIACANTHOS.

El albumen de las semillas de Gleditsia triacanthos fue estudiado por primera vez por Goret (1900). Por hidrólisis del mismo con ácido sulfúrico 3%, determinó el porcentaje de azúcares reductores (90%) y encontró galactosa y manosa. Asimismo observó que el endosperma era hidrolizable por la "seminasa", una enzima obtenida del albumen de las leguminosas.

Anderson (1949), estudiando los endospermas de 163 especies de leguminosas, encontró que 120 de las mismas (entre ellas la Gleditsia triacanthos) presentaban un endosperma mucilaginoso formado por un galactomanano. Las determinaciones semicuantitativas indicaron un porcentaje de endosperma del 35%, respecto del peso de la semilla. La extracción con agua caliente del mismo, varias veces hasta no más precipitación por adición de alcohol, permitió obtener el mucílago soluble (— 27%) y separarlo del remanente insoluble (— 8%) consistente en paredes celulares. Las determinaciones cuantitativas llevadas a cabo sobre el mucílago soluble (Anderson, 1949), figuran en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del mucílago del endosperma de Gleditsia triacanthos.

Componente ^a	%
Pentosano	0,0
Cenizas	0,3
Insoluble ^b	0,5
Anhidro manosa	70,5
Anhidro galactosa	26,5

^a El hidrolizado dio resultado negativo en el ensayo de ácidos urónicos con naftoresorcinol.

^b Insoluble remanente (oscuro) luego de la hidrólisis ácida. Las determinaciones colorimétricas de ácidos urónicos y pentosas dieron negativo.

Con el objeto de obtener nuevas fuentes de materia prima para la industria, Earle y Jones (1962) llevaron a cabo el estudio de la composición química de las semillas de una gran variedad de vegetales, cubriendo un total de 113 familias. Los resultados obtenidos con las semillas de Gleditsia triacanthos figuran en la Tabla 6.

Desde el punto de vista estructural, Lew y Gortner (1943) estudiaron la oxidación con periodato del galactomanano contenido en el albumen y observaron un consumo de 2 a 2,5 moles de periodato por unidad de hexosa y la formación de glioxal por hidrólisis del oxopolisacárido obtenido. Estos resultados fueron interpretados como indicativos de

Tabla 6. Composición química de las semillas de Gleditsia triacanthos^a.

Peso (g)/1000	—	194,9	150,9
Cenizas (600°) (%)	—	3,8	4,0
Proteínas (N x 6,25) (%)	20,6	21,8	22,1
Grasas (extracto étereo) (%)	2,6	2,3	1,7
Fracción de N soluble en etanol 70 % (%)	7,1	—	—
Fracción de N soluble en ácido tricloroacético 0,8 M (%)	12,8	11,5	—
Almidón ^b (%)	0	0	0
Alcaloides ^b (%)	0	0	0
Taninos ^b (%)	0	0	0

^a Las determinaciones se llevaron a cabo sobre tres muestras distintas.

^b Sobre una solución preparada por calentamiento de 200 mg de harina, libre de grasas, con 20 ml de agua y clarificada por filtración, se ensayó la presencia de almidón por adición de yodo, alcaloides con el reactivo de Wagner y taninos con cloruro férrico.

uniones $-(1\rightarrow6)-$ o de la presencia de cadenas laterales.

Sin embargo, los estudios posteriores efectuados por Moe y col. (1947) encontraron que el polisacárido requiere 1 mol de periodato por unidad de hexosa, liberándose igualmente glioxal por hidrólisis del oxopolisacárido, y por lo tanto correspondería a la presencia de una unión $-(1\rightarrow4)-$, aunque no excluyen la posibilidad de cadenas ramificadas, probablemente en $O-6$. La variación observada con respecto a los otros autores fue atribuida al uso de condiciones inadecuadas de oxidación. Además sugirieron que la sensibilidad de las soluciones del mucílago al bórax se debía a los grupos cis-glicol sobre los C-2 y -3 de la manosa.

Courtois y Le Dizet (1966) estudiaron el efecto de la α -galactosidasa, extraída de los granos de café, sobre varios galactomananos de distinta relación molar manosa: galactosa aislados de semillas de leguminosas (Trifolium repens, Genista scorparia, Gleditsia ferox, Gleditsia triacanthos y Ceratonia siliqua). En todos los casos se obtuvieron por hidrólisis enzimática, con velocidades iniciales similares, unidades α -D-galactosídicas y, salvo en el caso de la Genista scorparia, el tratamiento condujo a la obtención de un polisacárido insoluble (manano) cuya estructura fue determinada para la Gleditsia ferox.

La estructura del galactomanano extraído de las semillas de Gleditsia triacanthos, fue estudiada por Ieschziner y Cerezo (1970). Por extracción acuosa a 50 C se obtuvo un galactomanano homogéneo con un rendimiento de 15 a 20%, compuesto de D-manosa y D-galactosa en una relación molar de 3,2-3,5:1. Por oxidación con una solución de periodato de sodio 0,1 M, prácticamente todas las unidades de D-manosa y D-galactosa resultaron atacadas, ya que por reducción del oxopolisacárido y

posterior hidrólisis, se obtuvo glicerol y eritritol, y sólo trazas de manosa y galactosa. El consumo de periodato resultó de 4,7 moles cada 4 unidades de hexosa, liberándose simultáneamente 1 mol de ácido fórmico. Por hidrólisis del polisacárido metilado (1 mol) se obtuvo 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactosa (1 mol), 2,3,6-tri-O-metil-D-manosa (2,5 moles) y 2,3-di-O-metil-D-manosa (1 mol), así como también trazas de otros dos componentes que, en base a su comportamiento cromatográfico, podrían ser 2,3,4- y 2,3,6-tri-O-metil-D-galactosa. Estos resultados constituyen una buena evidencia de que la estructura básica del galactomanano de Gleditsia triacanthos, al igual que otros galactomananos solubles en agua conocidos, consiste en una cadena de β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranososa con cadenas laterales (una cada 3,2 a 3,5 unidades) formadas por restos de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranososa. En un pequeño número de esas cadenas puede estar unida -(1 \rightarrow 6)- otra molécula de D-galactosa, y también es posible que algunas unidades de -(1 \rightarrow 4)-D-galactosa formen parte de las mismas o de la cadena central.

D E
L E G U M I N O S A S

Las proteínas de semillas de leguminosas se caracterizan, al igual que otras proteínas vegetales, por el bajo contenido en aminoácidos azufrados comparado con el de las proteínas animales (Lugg, 1949; Van Etten y col., 1961a).

El tipo de proteínas más estudiadas son las de reserva, y a diferencia de otras familias, dentro de las leguminosas muy poco es lo que se sabe de las proteínas estructurales.

P R O T E I N A S D E R E S E R V A

Constituyen la mayor parte de las proteínas de la semilla (\approx 80%). Contienen los veinte aminoácidos denominados proteicos y poseen cantidades relativamente grandes de ácido aspártico y glutámico, leucina, aminoácidos básicos y amidas. Dado que la mayoría de estos aminoácidos tienen un alto porcentaje de nitrógeno, la composición estaría relacionada con la función de proporcionar compuestos nitrogenados para la respiración y el crecimiento durante los períodos de intensa actividad metabólica.

Estas proteínas tienen por lo general un alto peso molecular y pueden asociarse o disociarse a distintos tamaños moleculares en base al pH o a la fuerza iónica del medio. Son fundamentalmente globulinas, y éstas junto con las albúminas siempre predominan sobre las prolaminas y las glutelinas de las semillas; la albúmina de Pisum sativum constituye el 17% del nitrógeno proteico total, mientras que la legumina y la vicilina (globulinas) representan el 66% del mismo (Goa y Strid, 1960). No contienen hidroxiprolina (Van Etten y col., 1961 b), presencia que parece ser característica de las proteínas estructurales (Lamport y Northcote, 1960). En cambio se ha encontrado en algunos casos reacción positiva de hidratos de carbono (Glycine max, Wolf y col., 1966; Koshiyama, 1966), y se determinó la presencia de azúcares neutros como la manosa y de una hexosamina (Phaseolus vulgaris, Pusztai, 1965a); este último dato resultó consistente con la hipótesis de Pusztai (1964) sobre la presencia de glucosamina en las semillas de los vegetales superiores (ver Glicoproteínas que no pertenecen a las paredes celulares, pág. 23).

La composición en aminoácidos de proteínas de semillas de leguminosas se conoce sólo para muy pocas especies. La Tabla 7 muestra el promedio de la composición en aminoácidos encontrada por varios autores para la vicilina y la legumina aisladas de Pisum sativum, y la albúmina de las mismas semillas. En cambio, existen más datos sobre hari

nas o fracciones proteicas impuras.

Tabla 7. Composición en aminoácidos de las proteínas de *Pisum sativum* (g/16 g N).

Aminoácido	Vicilina ^a	Legumina ^a	Albumina ^b
Acido aspártico	12,0	12,5	11,7
Treonina	3,4	2,9	4,6
Serina	5,8	4,5	5,4
Acido glutámico	19,3	19,4	7,4
Prolina	3,5	4,3	6,1
Glicina	3,1	3,4	4,8
Alanina	3,0	3,7	5,3
Valina	4,6	4,6	5,4
Metionina	0,2	0,7	1,0
Isoleucina	5,1	4,0	4,8
Leucina	9,2	8,1	5,1
Tirosina	3,0	3,3	2,4
Fenilalanina	6,2	4,9	6,3
Lisina	7,9	4,9	7,7
Histidina	2,1	2,8	2,6
Arginina	7,3	10,5	5,0
Cistina (1/2)	0,4	0,7	5,4
Triptofano		1,1	2,4

^a Boulter y Derbyshire (1971).

^b Goa y Strid (1960).

La composición en aminoácidos de harinas de leguminosas está indicada en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición en aminoácidos de harinas de leguminosas (g/16g N)^a.

Aminoácido	<i>Lupinus albus</i>	<i>Lupinus luteus</i>	<i>Dolichos lablab</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Arachis hypogaea</i>
Acido aspártico		5,9			11,4		10,1	15,1
Treonina	4,6	2,0	3,3	4,8	4,2	3,9	6,5	2,6
Serina		2,7			4,7	3,1	4,9	6,6
Acido glutámico		23,0			19,3		7,9	21,7
Prolina		3,9			4,7		5,1	5,2
Glicina		2,0			3,8		4,9	5,7
Alanina		3,9			4,3		6,2	2,9
Valina	3,7	4,6	5,6	5,5	4,5	4,6	6,1	5,7
Metionina	1,6	1,0	0,7	1,2	1,0	1,1	1,6	0,8
Isoleucina		3,7	6,0	5,1	4,3	5,0	4,8	4,6
Leucina	12,0	7,5	9,0	4,9	7,6	6,6	10,2	6,6
Tirosina		2,6			2,9		2,4	3,2
Fenilalanina	5,1	3,9	5,4	5,3	3,4	4,6	5,4	4,6
Lisina	4,4	3,8	8,1	7,1	5,9	5,0	5,0	3,2
Histidina	2,4	1,9	2,8	2,8	3,1	1,7	2,0	2,9
Arginina	9,5	6,2	9,2	6,9	7,6	7,7	5,3	10,0
Cistina (1/2)	1,3	0,7			1,7	1,2	2,6	0,9
Triptofano	1,0	1,0	0,5	1,4	1,3	0,8	2,1	1,4

^a Boulter y Derbyshire (1971).

La composición en aminoácidos de harinas de semillas de las que previamente se separó la cubierta (Van Etten y col., 1961 a) figura en la Tabla 9. En el caso de las semillas de soya (Rackis y col., 1961), se llevó a cabo la remoción del 95% de la corteza y el 50% del hipocotilo, los que a su vez fueron analizados en su composición en aminoácidos. La diferencia entre las tres fracciones radica fundamentalmente

en la presencia de hidroxiprolina y los valores para la glicina (Tabla 9).

Tabla 9. Composición en aminoácidos de harinas de semillas sin cubierta (g/16g N).

Aminoácido	<u>Clitoria</u> <u>ternatea</u>	<u>Corinilla</u> <u>varia</u>	<u>Cyamopsis</u> <u>tetragono-</u> <u>lobus</u>	<u>Lespedeza</u> <u>stipulacea</u>	<u>Lupinus</u> <u>luteus</u>	<u>Sesbania</u> <u>exaltata</u>	<u>Trifolium</u> <u>incarnatum</u>	<u>Trigonella</u> <u>foenum-</u> <u>graceum</u>	<u>Glycine max</u>		
									Harina	Corteza	Hipocotilo
Acido aspártico	9,3	8,6	10,2	11,3	10,1	8,2	11,0	10,9	12,0	10,1	9,7
Treonina	2,2	2,9	2,8	3,0	3,1	2,8	3,1	3,0	4,3	3,7	4,0
Serina	5,0	4,4	4,9	5,9	4,9	4,0	4,7	5,2	5,6	7,0	4,9
Acido glutámico	15,6	13,7	20,1	16,7	24,4	14,6	16,5	15,8	21,0	8,7	13,8
Prolina	3,3	3,2	3,1	3,7	3,2	3,0	3,4	4,6	6,3	5,7	4,2
Glicina	4,1	4,8	5,1	4,1	4,0	4,3	4,1	4,4	4,5	11,1	4,3
Alanina	3,5	3,8	4,2	3,8	3,4	3,2	4,1	4,0	4,5	4,0	4,7
Valina	4,4	3,9	4,2	4,2	3,5	4,2	4,4	3,4	5,4	4,6	4,8
Isoleucina	1,0	0,8	1,4	1,0	0,5	1,3	1,4	1,3	1,6	0,8	1,7
Isoleucina	4,2	3,0	3,2	3,9	3,9	4,0	4,2	4,5	5,1	3,8	4,1
Leucina	7,4	5,6	5,9	7,2	7,5	6,2	7,3	6,8	7,7	5,9	6,6
Tirosina	6,9	5,9	7,0	8,5	6,3	6,8	6,7	6,3	3,9	4,7	3,5
Fenilalanina	3,6	3,1	3,7	4,3	3,6	3,9	3,9	3,8	5,0	3,2	3,9
Lisina	6,1	4,1	4,0	5,3	4,8	4,7	6,5	6,0	6,9	7,1	7,5
Histidina	2,4	2,4	2,5	2,6	2,5	2,4	2,7	2,0	2,6	2,5	2,6
Arginina	7,4	6,5	12,5	11,9	9,9	7,6	9,8	9,2	8,4	4,4	8,3
Cistina (1/2)	3,5	1,9	2,0	2,5	2,0	1,7	2,1	2,5	1,6	1,7	1,2
Triptofano	1,2	1,3	1,9	1,4	1,0	1,7	1,8	1,6	1,3		
Hidroxiprolina									0	7,6	Tr

PROTEINAS ESTRUCTURALES

La presencia de hidroxiprolina ha sido estudiada con más detalle por Van Etten y col. (1961 b) en semillas de 99 especies distribuidas en 30 familias. La Tabla 10 muestra el resumen de los datos: cuando está presente, la hidroxiprolina está asociada con la testa o el pericarpio. Excepto por trazas que pueden deberse a contaminaciones de estas partes del fruto, no se encontró hidroxiprolina en harinas derivadas de semillas descortezadas; las especies analizadas en este último caso fueron once, entre las que figuran las leguminosas Acacia farnesiana y Ceratonia siliqua.

Tabla 10. Contenido en hidroxiprolina de harinas de 99 especies.

Parte analizada	Número de especies que presentan el contenido en hidroxiprolina (g/16g N) indicado		
	0 a trazas	0,1 a 1,0	> 1,0
Semilla descortezada	11	0	0
Semilla entera	21	32	19
Semilla entera más pericarpio	4	7	5

Como derivación de los datos anteriores se examinaron en forma cualitativa 12 muestras de pericarpio, 8 de testa y 8 formadas por testa y pericarpio pertenecientes a especies no incluidas en la Tabla 10. Sólo tres especies dieron ensayo negativo para hidroxiprolina. El análisis cuantitativo se llevó a cabo (Tabla 11) sobre 8 muestras de pericarpio o testa. Las 4 primeras especies contienen las mayores can-

Tabla 11. Contenido en hidroxiprolina de los hidrolizados ácidos solubles de pericarpio o testa de vegetales seleccionados.

Especie	Familia	Parte analizada	Nitrógeno (%)	Hidroxiprolina (g/10g N)
<i>Iris germanica</i>	Iridaceae	Testa	2,1	10,0
<i>Citrullus vulgaris</i>	Cucurbitaceae	Testa	0,2	6,9
<i>Sapindus mukorossi</i>	Sapindaceae	Pericarpio	0,3	6,3
<i>Sapindus mukorossi</i>	Sapindaceae	Testa	1,5	5,1
<i>Acacia farnesiana</i>	Leguminosae	Testa	1,0	4,1
<i>Celtis acuminata</i>	Rosaceae	Testa	1,0	3,9
<i>Calycanthus floridus</i>	Calycanthaceae	Pericarpio	0,3	3,1
<i>Crambe abyssinica</i>	Cruciferae	Pericarpio	1,6	3,1

tidades de hidroxiprolina y pertenecen al grupo cuyas harinas de semillas descortezadas no contenían hidroxiprolina. La presencia de hidroxiprolina en la testa y el pericarpio de las semillas sugirió que estas partes contenían proteínas estructurales, es decir, proteínas componentes de las paredes celulares.

Ya en 1888 Weissner proponía que las paredes celulares contienen proteínas. Sin embargo esta suposición fue posteriormente atribuida a la contaminación, hasta que estudios subsiguientes demostraron la distribución general de las proteínas en las paredes primarias de los vegetales superiores (Lamport y Northcote, 1960, y referencias allí citadas). Si bien es difícil saber cuando una proteína encontrada en una preparación de paredes celulares aisladas es un constituyente de la pared o si su presencia es debida a una adsorción no específica del citoplasma, se ha encontrado que parte de la proteína de la pared contiene hidroxiprolina (Lamport, 1965) y sólo trazas de este aminoácido aparecen en las proteínas del citoplasma, con lo que se concluyó que una proteína que contiene hidroxiprolina pertenece a las paredes celulares. Los resultados de los análisis efectuados por Lamport y Northcote (1960) están indicados en la Tabla 12. Prácticamente toda la hidroxiprolina aparece en los hidrolizados de paredes celulares, mientras que sólo trazas ($< 0,1\%$) se encontraron en los hidrolizados de los contenidos celulares. No se detectaron aminoazúcares.

Tabla 12. Contenido en hidroxiprolina de células y fracciones de células (% sobre peso seco).

Especie	Parte analizada	Célula	Pared celular	Contenido celular
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Suspensión de células	0,51	1,28	$< 0,1$
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Callo	0,43	2,7	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hipocotilo	0,36	0,9	"

Tabla 13. Composición en aminoácidos de las paredes celulares (g/16g N).

Aminoácido	<u>Acer</u> <u>pseudoplatanus</u> ^a	<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u> ^c	<u>Nicotiana</u> <u>tabacum</u> ^b	<u>Pisum sativum</u> ^c		<u>Lycopersicon</u> <u>esculentum</u> ^c	<u>Solanum</u> <u>tuberosum</u> ^c	<u>Rose</u> ^c	<u>Ginkgo</u> <u>biloba</u> ^c	<u>Centauros</u> <u>cyaneus</u> ^c
				Epicotilo	Raíz					
Acido aspártico	8,5	12,0	5,6	8,2	7,6	5,8	7,0	8,1	10,0	7,9
Treonina	3,8	3,8	5,5	5,2	6,5	5,2	5,2	6,5	5,1	7,0
Serina	9,4	7,8	8,0	8,1	5,7	8,1	7,1	6,4	4,4	6,8
Acido glutámico	8,3	9,9	4,4	11,1	13,9	7,9	11,0	13,2	10,8	15,0
Prolina	4,5	7,8	5,9	6,7	5,1	5,8	5,8	8,3	4,1	5,2
Glicina	3,2	3,8	2,7	6,4	4,6	4,9	5,0	6,0	8,3	2,9
Alanina	3,6	3,2	2,8	4,8	5,3	2,8	4,8	4,6	4,7	6,4
Valina	6,2	8,2	6,4	6,0	7,2	6,0	6,1	5,9	6,3	6,9
Metionina	1,6	1,2	0,5	Tr	Tr	0,5	2,0	1,2	Tr	2,6
Isoleucina	3,7	3,5	2,3	5,0	5,3	4,4	4,8	4,1	4,4	4,6
Leucina	5,8	6,5	3,7	8,4	8,5	4,6	8,3	10,1	6,9	8,4
Tirosina	5,1	3,9	4,7	1,8	3,6	2,9	4,6	2,0	3,8	Tr
Fenilalanina	4,4	3,5	2,1	3,8	4,9	2,9	5,4	2,8	5,4	4,1
Lisina	13,1	11,0	11,7	8,5	9,9	10,4	8,5	11,4	6,7	9,2
Histidina	3,4	2,6	3,2	1,4	3,0	2,5	2,3	1,2	3,6	4,0
Arginina	3,4	3,9	3,3	2,5	4,1	1,7	7,3	2,5	2,2	3,7
Hidroxiprolina	12,9	6,6	20,5	7,2	5,3	16,1	9,6	5,9	5,7	4,9

^a Lampert y Northcote (1960).^b Dougall y Shimbayashi (1960).^c Lampert (1965).

La composición en aminoácidos de los hidrolizados de las paredes celulares (primarias) de diferentes especies figuran en la Tabla 13. Las dos únicas leguminosas estudiadas fueron: Phaseolus vulgaris, paredes aisladas de un cultivo de células en suspensión, y Pisum sativum, epicotilo y raíz. Del análisis de los datos se deduce que los aminoácidos estables al ácido comúnmente encontrados en las proteínas, están también presentes en los hidrolizados de paredes celulares primarias. El rasgo más sobresaliente de ese análisis, aparte de la existencia de hidroxiprolina, es el amplio rango de valores para un dado aminoácido cuando se compara la composición de las paredes celulares. El rango tan amplio permitió suponer que además de la proteína rica en hidroxiprolina ("extensina", Lampert, 1965) existe otra proteína firmemente unida a la pared. Sin embargo, hasta el momento se considera que la pared contiene una única proteína, rica en hidroxiprolina y que esta proteína representa el total de la proteína de la pared; las variaciones serían de valor taxonómico. De hecho, la composición de dos especies de la familia Solanaceae, la Nicotiana tabacum y la Lycopersicon esculentum, muestran una sorprendente similitud (Tabla 13).

Burke y col. (1974) estudiaron el contenido en proteína e hidroxiprolina de las paredes celulares primarias de seis monocotiledóneas y encontraron (Tabla 14) cantidades significativas de proteínas pero muy baja proporción de hidroxiprolina comparado con el de las dicotiledóneas. En consecuencia establecieron que si la proteína es estruc

tural, debe ser muy diferente de la proteína de paredes celulares de dicotiledóneas.

Tabla 14. Composición en proteína e hidroxiprolina de las paredes celulares primarias (g/100 g)

Especie	Proteína	Hidroxiprolina
Monocotiledóneas		
<u>Triticum vulgare</u>	11	0,14
<u>Avena sativa</u>	16	-
<u>Oryza sativa</u>	17	0,13
<u>Saccharum officinalis</u>	15	0,14
"Brome grass"	14	0,16
<u>Lolium perene</u>	7	< 0,05
Dicotiledónea		
<u>Acer pseudoplatanus</u>	10	2,0
Gimnosperma		
Pino "Douglas"	16	0,4

GLICOPROTEINAS
DE
VEGETALES SUPERIORES

INTRODUCCION

En contraste con la amplia información existente sobre la estructura y distribución de las glicoproteínas de origen animal, los productos similares obtenidos de los vegetales superiores no han sido muy estudiados, a pesar que estos compuestos son constituyentes importantes de las paredes celulares (Lampert, 1970), se encuentran en el endosperma (Fincher y col., (1974) y el citoplasma (Lampert, 1970) y poseen actividad hemoaglutinante (Allen y Neuberger, 1973).

Teniendo en cuenta las diferencias existentes en cuanto a la composición química y la función dentro de la célula, y a modo de introducción al trabajo realizado, se han seleccionado para este capítulo los siguientes temas:

GLICOPROTEINAS DE PAREDES CELULARES

La investigación sobre la naturaleza y función de las glicoproteínas de las paredes celulares, se ha visto dificultada por los problemas inherentes al aislamiento, dado que la mayoría parecen estar unidas y entrecruzadas con los polisacáridos de la pared (ver Paredes celulares de vegetales superiores: composición química y estructura, pág. 30).

Por analogía con el colágeno (proteína estructural animal), las glicoproteínas vegetales que contienen hidroxiprolina fueron originariamente asociadas con los componentes estructurales de las paredes celulares (Dougall y Shimbayashi, 1960; Lampert y Northcote, 1960) y las evidencias experimentales indicaron en todos los casos (King y Bayley, 1965) que la proteína que contiene hidroxiprolina es parte integral de las paredes de células en crecimiento activo (paredes primarias).

Durante el transcurso de los estudios sobre las paredes primarias aisladas de cultivos de células en suspensión, Lampert (1967) obtuvo por degradación alcalina parcial ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,215 M) de paredes celulares secas de tomate, una serie de glicósidos conteniendo hidroxiprolina. Estos glicósidos fueron identificados como tri y tetrasacáridos de arabinosa unidos glicosídicamente a una molécula de hidroxiprolina. Se dedujo que la unión era O-glicosídica entre el extremo reductor del oligosacárido de arabinosa y el grupo hidroxilo en C-4 de la hidroxiprolina, en razón de su estabilidad al álcali y a la presencia de un carboxilo libre y un grupo amino secundario libre en el resto de

hidroxiprolina. Dado que la hidroxiprolina constituye aproximadamente un 30 % del total de los aminoácidos de las paredes celulares de tomate y un 70 % de la hidroxiprolina es liberada como glicósidos, el autor sugirió que la mayor parte, si no todos, de los numerosos residuos de hidroxiprolina están involucrados en la unión hidrato de carbonopéptido.

Glicósidos de este tipo también se han aislado de cultivos de células en suspensión de Acer pseudoplatanus (Talmadge y col., 1973). Sin embargo, de hipocotilos de Lupinus albus, Monro y col. (1974) aislaron una glicoproteína rica en hidroxiprolina en la cual los componentes que contienen el aminoácido estarían unidos a los polisacáridos insolubles de la pared, como la celulosa, a través de la galactosa o por unión directa de la proteína a la celulosa, más que a los polisacáridos no celulósicos (xilanos).

Pusztai y Watt (1969) aislaron y purificaron de las hojas de Vicia faba, glicoproteínas solubles en fenol caracterizadas por su diferente composición, peso molecular y solubilidad. La glicoproteína más importante contiene de un 9 a un 14 % de galactosa y arabinosa como monosacáridos principales y cantidades menores y variables de manosa, xilosa, fucosa y ramnosa. De la composición en aminoácidos (Tabla 15) sobresalen la hidroxiprolina, la serina y la treonina.

De las paredes celulares de Acer pseudoplatanus, Heath y Northcote (1971) aislaron una glicoproteína rica en hidroxiprolina (28,6 moles/100 moles de aminoácidos). Esta proteína es insoluble y permanece junto con la α -celulosa luego de extraer los polisacáridos con EDTA 0,5% (pH 6,8) a 100 C y posterior tratamiento con NaOH 17,5%-ácido bórico 4%. La composición (fracción 3) está indicada junto con la de la pared celular en la Tabla 15. La glicoproteína contiene una alta proporción de arabinosa y galactosa, al igual que la pared celular total, pero la proporción de hidroxiprolina es mucho mayor a pesar de que el resto de la proteína permanece constante. Además de la α -celulosa, la fracción contiene un arabano y un galactano, pero no presenta ácidos urónicos. Por hidrazinólisis de la fracción 3 se obtuvieron glicopéptidos solubles, y por fraccionamiento y purificación se aisló un glicopéptido formado por hidroxiprolina, arabinosa y galactosa, cuya composición (10%, 35% y 55%, respectivamente) indicó que la parte peptídica consiste en una serie de moléculas de hidroxiprolina unidas a copolímeros de galactosa y arabinosa a través de enlaces furanósicos.

Tabla 15. Composición en monosacáridos y aminoácidos de las glicoproteínas de paredes celulares.^a

Componente	Vicia faba	Acer pseudoplatanus	
		Pared celular	Fracción 3
Arabinosa	62,9	22	26
Fucosa	2,3		
Ramnosa			
Xilosa	1,5	9	8
Mannosa	4,9	1	1
Galactosa	20,1	21	18
Glucosa	4,9	47	47
Ácidos urónicos	0	ND	0
Glucosamina	3,4		
Ácido aspártico	7,4	8,2	5,6
Treonina	11,7	3,9	3,0
Serina	5,5	7,8	7,0
Ácido glutámico	5,7	9,4	7,7
Prolina	4,7	7,3	8,3
Glicina	4,2	3,4	2,1
Alanina	3,6	3,8	2,7
Valina	4,5	6,4	7,0
Metionina	1,6	0,2	0,4
Isoleucina	4,0	3,4	2,6
Leucina	5,9	5,5	4,1
Tirosina	5,2	3,6	3,7
Fenilalanina	1,9	3,4	2,6
Lisina	6,8	8,5	9,0
Histidina	2,5	2,4	2,6
Arginina	4,6	3,8	2,0
Cistina (1/2)	0	0,4	
Hidroxiprolina	18,1	19,0	29,6

^a Los resultados se expresaron de la siguiente manera: monosacáridos, moles %; aminoácidos, g/10g N.

GLICOPROTEÍNAS QUE NO PERTENECEN A LAS PAREDES CELULARES

La composición de las albúminas de cebada y maíz fue estudiada por Waldschmidt-Leitz y Hochstrasser (1961) y por análisis de los componentes de las mismas obtenidos por electroforesis, determinaron (Tabla 16) la presencia de un polisacárido, parte del cual está unido covalentemente a la proteína. Por hidrólisis sólo obtuvieron arabinosa, xilosa y glucosa. Por tratamiento de la albúmina de cebada con tripsina e hidrólisis de los glicopéptidos, Hochstrasser (1961) aisló una sustancia reductora de naturaleza básica, que resultó ser la 4-O-L-alanil-D-xilopiranososa. Sin embargo, al estudiar los productos de hidrólisis ácida parcial de los glicopéptidos, Hochstrasser (1963) determinó que el ácido aspártico es el aminoácido principalmente involucrado en las uniones hidratos de carbono-péptido.

Los pentosanos de harina de trigo fueron fraccionados por cromatografía sobre geles y se aislaron (Kunding y col., 1961) cinco fracciones, cuatro de las cuales se caracterizaron como glicoproteínas. Los polisacáridos componentes están formados por arabinosa, xilosa y galactosa (salvo una fracción que sólo contiene arabinosa y galactosa), y constituyen de un 63 % a un 83 % del total de las glicoproteínas.

Tabla 16. Composición en monosacáridos y aminoácidos de glicoproteínas vegetales que no pertenecen a paredes celulares.

Componente ^a	Albúmina de cebada	Albúmina de <i>maíz</i>	Hemoglutinina de harina de soya	Phaseolus vulgaris			Phaseolus aureus Pico III	Fitohemaglutinina	
				Glicoproteína I	Glicoproteína II	Glicoproteína Principal		Robinia pseudoacacia	Phaseolus vulgaris ^c
Arabinosa	26,0	17,5			Tr				29,2
Xilosa	37,6	28,4			9,3				0
Manosa				73,4	69,0	80,6	90,0		26,3
Galactosa					Tr		Tr		19,3
Glucosa	36,4	54,0					Tr		9,6
Ácidos urónicos				0	0				
Glucosamina			100 ^b	26,6	21,7	19,4	10,0		9,0
Pentosas				3,2					
Metilpentosas				0,8					6,6 ^d
Azúcares neutros					4,5	4,5	1,8		
Ácido aspártico	8,7	6,1	14,7	16,0	12,4	11,3	16,9	9,9	13,3
Treonina	2,8	2,2	5,6	7,8	3,4	3,1	3,3	5,5	6,4
Serina	3,6	3,6	4,8	11,4	6,7	6,6	7,0	6,3	7,6
Ácido glutámico	9,8	13,7	7,8	8,8	15,1	15,3	2,8	6,7	6,2
Prolina	5,1	6,5	4,1	3,4	2,9	2,8	3,1	3,5	3,0
Glicina	4,1	2,4	3,1	2,8	2,7	2,7	3,4	4,6	3,3
Alanina	5,8	4,3	5,4	3,9	3,0	2,9	4,4	3,8	3,4
Valina	5,9	6,3	5,3	7,8	5,2	4,9	7,2	5,3	6,0
Metionina	0,3	0	1,3	1,2	0,7	0,9	0,4	0,4	Tr
Isoleucina	3,2	3,2	6,2	4,8	5,6	4,7	5,6	3,8	3,7
Leucina	6,3	8,3	3,4	5,4	9,1	7,9	11,7	6,1	7,4
Tirosina	3,5	2,6	2,8	4,6	3,5	3,1	3,4	3,1	3,1
Fenilalanina	3,6	3,9	5,7	7,1	6,6	6,0	9,9	7,8	6,9
Lisina	6,2	8,5	3,2	4,4	5,6	6,1	8,4	3,7	3,6
Histidina	4,2	3,3	2,2	1,7	2,6	3,1	3,0	1,4	0,9
Arginina	5,6	5,8	5,7	5,0	5,0	4,9	9,4	3,5	3,5
Cistina (1/2)	0,2	5,2	1,5	0,1	0,3	0,4		0	Tr
Hidroxilisina	0	0,2							
Triptófano			4,7	3,3	0,8	1,0		2,7	2,7
Proteínas	92,5	91,7		93,1	97,8	91,9	96,2		

^a Los resultados se expresaron de la siguiente manera: Monosacáridos, moles %, aminoácidos, g/16g N; pentosas, metilpentosas, azúcares neutros y proteínas, g/100 g.

^b Contiene 10,2 g/100g.

^c Se indicó la composición en monosacáridos del glicopéptido aislado a partir de la fitohemaglutinina.

^d Moles %.

Wada y col. (1958) encontraron evidencia cromatográfica de la presencia de glucosamina, pero no de otros azúcares, en los hidrolizados ácidos de la hemoglutinina purificada de la harina de soya (Tabla 16). Las proteínas que contienen glucosamina se han encontrado en una gran variedad de vegetales (Pusztai, 1964). En efecto, cuando los tejidos vegetales fueron incubados en presencia de glucosamina marcada, se determinó su incorporación en un gran número de glicoproteínas tanto intracelulares como extracelulares (Roberts, 1970; Roberts y col. 1971, 1972).

Pusztai (1964) sugirió que las semillas de *Phaseolus vulgaris* contienen proteínas que poseen aminoazúcares, y que los azúcares neutros están firmemente unidos a la fracción peptídica de las mismas. El aminoazúcar fue aislado, cristalizado e identificado como 2-amino-2-de

soxi-D-glucosa. Al estudiar con mayor detalle estas glicoproteínas, Pusztai (1965a) encontró D-manosa y D-glucosamina, probablemente N-acetilada, como únicos azúcares componentes. Los resultados obtenidos por extracción con solventes fenólicos, desnaturalización, precipitación y digestión enzimática, le permitieron postular (Pusztai, 1966 a) la existencia de un fuerte enlace entre los azúcares y los aminoácidos, más que una simple asociación, ya que ninguna de las técnicas no hidrolíticas usadas permitieron separar el polisacárido de la proteína.

De las mismas semillas, Pusztai (1965b; 1966b) aisló dos proteínas de composición marcadamente diferentes. Una de ellas, en concordancia con los resultados obtenidos previamente, resultó ser una glicoproteína (glicoproteína I, Tabla 16). Los azúcares componentes son fundamentalmente D-manosa y D-glucosamina, junto con pequeñas cantidades de arabinosa. La composición en aminoácidos indica que es rica en aminoácidos aromáticos y no contiene cistina. De los cotiledones de las semillas, Pusztai y Watt (1970) aislaron y caracterizaron una glicoproteína (glicoproteína II, Tabla 16) cuya composición en hidratos de carbono es semejante a otras glicoproteínas vegetales solubles caracterizadas previamente. El rasgo más importante es la presencia de glucosamina y manosa como principales componentes de las unidades de hidratos de carbono, y a diferencia de los resultados obtenidos por Jaffé y Hanning (1965) con otra variedad de la misma especie, sólo se encontraron trazas de otros azúcares (salvo xilosa) como ramnosa, galactosa y glucosa, y no se detectaron ácidos urónicos. La composición en aminoácidos indicó una deficiencia en aminoácidos azufrados.

Es interesante destacar que la distribución de las glicoproteínas en el reino vegetal y el alto contenido en glicoproteínas que presentan las semillas de los vegetales superiores, comparadas con las partes verdes (Jennings y col., 1968), parecería indicar que las mismas cumplen un papel especial en el ciclo de vida de la planta y actuarían como proteínas de reserva.

A este respecto, Racunsen y Foote (1971) encontraron en los cotiledones de Phaseolus vulgaris, una proteína similar a las descritas que representa un 35% de la proteína total. Por hidrólisis se obtuvieron (glicoproteína principal, Tabla 16) manosa y glucosamina, junto con trazas de pentosas. La composición en monosacáridos y aminoácidos es semejante a la de la glicoproteína II aislada por Pusztai y Watt (1970) y las escasas diferencias observadas fueron atribuidas a las distintas variedades utilizadas. Si bien estos autores sugirieron que la glicoproteína aislada es una proteína de reserva, no les fue posi-

ble confirmar si la proteína o la glucosamina desaparecían de los cotiledones durante la germinación y el crecimiento subsiguiente. En cambio, Ericson y Chrispeels (1973), aislaron de los cotiledones de Phaseolus aureus, otra especie de las leguminosas relacionada con la anterior, proteínas que contienen glucosamina y que son metabolizadas durante la germinación. Análogamente, la glucosamina resultó concomitantemente metabolizada, lo que indicó que está unida a proteínas específicas de reserva. La caracterización de estas proteínas mostró que son idénticas a la vicilina y a la legumina, las principales proteínas de reserva de las leguminosas (ver Proteínas de reserva pág. 15, Tabla 7). La composición en aminoácidos y monosacáridos de la vicilina de Phaseolus aureus (pico III, Tabla 16) concuerdan con los de la vicilina de Vicia faba (Millerd y col., 1971), y los datos obtenidos para la legumina (pico IV) coinciden con los informados por Bailey y Boulter (1970) y Miller y col. (1971) para la legumina de Vicia faba. Además, la comparación de los datos (Tabla 16) indicó que el "pico III" es idéntico a la "glicoproteína II" y a la "proteína principal" de Phaseolus vulgaris. Los autores concluyeron que las proteínas de reserva más importantes de la leguminosa Phaseolus aureus, son verdaderas glicoproteínas que contienen pequeñas cantidades de glucosamina y azúcares neutros. Recientemente, Barker y col. (1976) purificaron y caracterizaron las principales proteínas de reserva de Phaseolus vulgaris y encontraron que las mismas están localizadas en el cuerpo proteico, en base a la presencia de sus subunidades en las preparaciones de cuerpos proteicos aislados. Observaron, asimismo, diferencias en la distribución de dichas subunidades en la parte externa y central de los cotiledones.

Desde otro punto de vista, se observó que varios tejidos vegetales presentan proteínas y glicoproteínas que pueden unirse a hidratos de carbono con una alta afinidad y especificidad estructural. Esas lectinas o fitohemoglutininas se han convertido en objeto de creciente interés. La familia de las leguminosas resultó ser una buena fuente de lectinas.

Lis y col. (1966 a) aislaron de la harina de soya, una fitohemoglutinina que contiene 4,5 % de manosa y 1,0 % de glucosamina. Por digestión enzimática exhaustiva obtuvieron 2-acetamido-1-N-(4"-L-aspartil)-2-desoxi-3-D-glucosamina, lo que indicaría el punto de unión entre los hidratos de carbono y la proteína. De la globulina de harina de soya, Koshiyama (1969) aisló un glicopéptido similar. Además de estas glicoproteínas, Lis y col. (1966 b) encontraron tres fitohemoglutininas distintas más, que contienen entre 4,2 y 8,2 % de manosa y 0,7 y

0,9% de glucosamina.

Bourrillon y Font (1968) purificaron una fitohemaglutinina de Robinia pseudoacacia (Tabla 16) que posee fucosa, xilosa, manosa y glucosamina como monosacáridos componentes, junto con trazas de glucosa. La composición en aminoácidos se caracteriza por la ausencia de aminoácidos azufrados y el predominio de serina y de los ácidos aspártico y glutámico.

De las semillas de Phaseolus vulgaris Jaffé (1962) obtuvo una fracción proteica de actividad hemoaglutinante que contiene un 30 % de hidratos de carbono (fucosa, xilosa y galactosa), y Takahashi y col. (1967) purificaron una lectina (Tabla 16) que contiene manosa como azúcar principal y pequeñas cantidades de arabinosa, fucosa, xilosa, galactosa y glucosamina.

N A T U R A L E Z A D E L E N L A C E H I D R A T O D E C A R B O N O - P R O T E I N A .

La característica estructural más importante de las glicoproteínas es el enlace covalente entre el azúcar y el aminoácido que une las unidades de hidratos de carbono a las cadenas peptídicas. Este enlace involucra siempre el C-1 del azúcar y un grupo funcional del aminoácido.

Los tres tipos de uniones glicopéptidas encontradas con mayor frecuencia en las glicoproteínas vegetales son:

- Glicosilamina: la unión con el grupo amida de la asparagina es N-glicosídica y corresponde siempre a la N-acetilglucosamina.
- Uniones O-glicosídicas entre el azúcar y el grupo hidroxilo de la serina o la treonina. Lempert y col. (1973) y Lempert (1975) presentaron evidencia de que el azúcar involucrado en este tipo de enlace para el complejo extensina-polisacárido (ver Estructura molecular de las paredes celulares, pág. 33) es la galactosa.
- Uniones O-glicosídicas entre la arabinosa y el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina.

a) El enlace N-glicosídico entre la N-acetilglucosamina y la asparagina (Figura 3) fue el primer enlace glicopéptido descripto (Johansen y

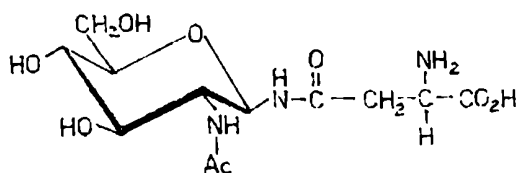


Figura 3. 2-Acetamido-1-N-L-aspartil-2-deoxi- β -D-glucopiranosilamina.

col., 1961); la estructura fue determinada por aislamiento de la N-acetilglucosaminilasparagina y comparación con el compuesto sintetizado (Marshall y Neuberger, 1964).

Algunas glicoproteínas de vegetales superiores, tal como la fitohemoglutina de harina de soya (Lis y col., 1966 a) presentan este tipo de enlace. La unión es relativamente estable a los ácidos y a los álcalis (tiempo de vida media de 17 minutos en HCl 2 M a 100 C, y de 100 minutos en NaOH 0,2 M a 100 C) y es hidrolizado en condiciones más energéticas (HCl 4 N, 3 horas a 100 C) (Marks y col., 1963).

b) La estructura correspondiente al enlace O-glicosídico entre el monosacárido y la serina o la treonina, está indicada en la Figura 4.

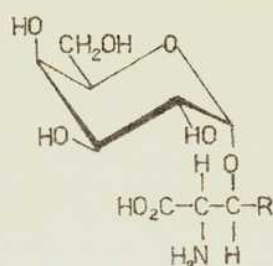
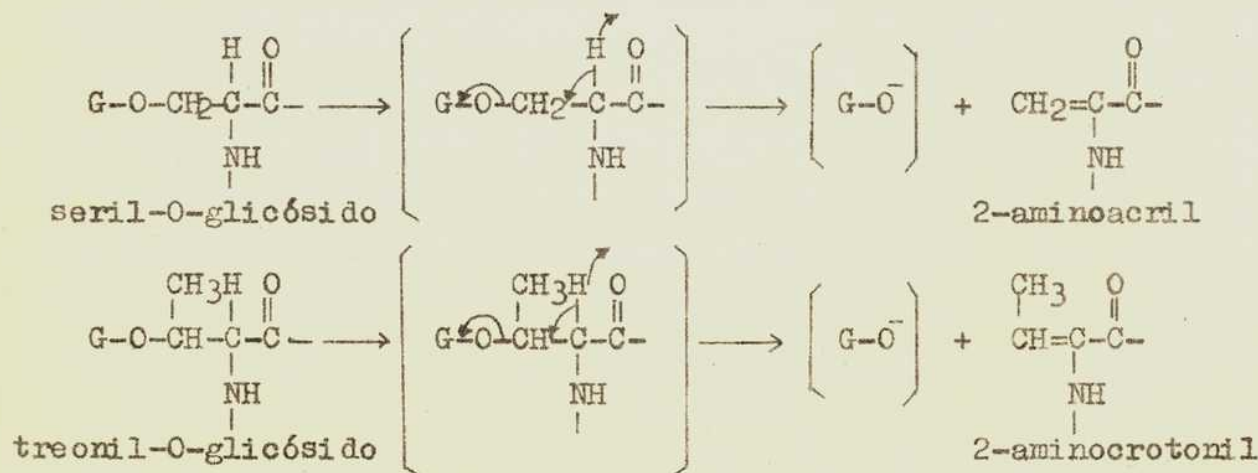


Figura 4. O-(α -D-galactopiranosil)-L-serina (R=H) o -L-treonina (R=CH₃).

Este tipo de enlaces que involucran un ácido α -amino- β -hidroxicarboxílico se caracterizan por dar lugar, en condiciones alcalinas suaves (por ejemplo, NaOH 0,1 N, 37 C durante 48 horas), a una reacción de β -eliminación con liberación del hidrato de carbono, formación del correspondiente aminoácido α, β no saturado (Figura 5) y ruptura de la unión hidrato de carbono-proteína (Anderson y col., 1965; Adams, 1965 a, 1965 b).

Figura 5. Mecanismo de la ruptura por β -eliminación de la unión O-glicosídica a los α -amino- β -hidroxiácidos (G= glicosil).



La reacción de eliminación se ve favorecida cuando el grupo carboxilo y el grupo amino del aminoácido O-glicosilado están sustituidos.

c) De paredes celulares se han aislado glicoproteínas en las cuales la

arabinosa está unida O-glicosídicamente (Figura 6) a la hidroxiprolina (Lamport, 1969). Es interesante notar que la hidroxiprolina encontrada en las glicoproteínas de origen animal no parece estar involucrada en el enlace glicopéptido. Este tipo de unión es estable en las condiciones de ruptura por β -eliminación de las uniones glicosídicas en las que participa el hidroxilo de la serina o treonina y oligosacáridos de arabinosa que contienen 4-hidroxil-L-prolina se aislaron (Lamport, 1969) por tratamiento de las paredes celulares con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,44 N a 90-105 C durante 6 a 8 horas.

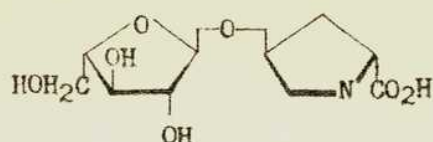


Figura 6. O-(α -L-arabinofuranosil)-L-hidroxiprolina.

Recientemente (Fincher y col., 1974) han encontrado también D-galactosa unida glicosídicamente a la hidroxiprolina en un glicopéptido aislado de endosperma de trigo.

Si bien la mayoría de las glicoproteínas presentan un único tipo de enlace hidrato de carbono-proteína, se han encontrado ejemplos de la posible presencia de dos tipos de uniones (Keegstra y col., 1973; Fincher y col., 1974).

Las diferentes propiedades de estos enlaces hacen posible una evaluación primaria de los mismos en las glicoproteínas no caracterizadas. En efecto, los enlaces a serina y treonina pueden ser identificados y cuantificados por el análisis de los productos de β -eliminación. Las uniones a hidroxiprolina pueden ser determinadas luego de la hidrólisis con álcali fuerte. Si ninguno de estos enlaces queda demostrado luego del tratamiento alcalino correspondiente, la unión a asparagina resulta probable, y para establecer esto es necesario aislar y caracterizar los glicopéptidos que contienen esta unidad.

Aunque el tema será detallado (ver Efectos de la extracción en medio alcalino, pág. 48), cabe recordar que el álcali concentrado, comúnmente empleado para aislar las hemicelulosas, puede degradar los complejos de estos polisacáridos con las proteínas.

PAREDES CELULARES

DE

VEGETALES SUPERIORES:

COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA

INTRODUCCION

Las células de los vegetales se distinguen de las células animales por la presencia de verdaderas paredes celulares que contienen polisacáridos como material estructural. Las paredes celulares de los vegetales superiores contienen generalmente celulosa, la cual, como material cristalino y rígido, forma un esqueleto de microfibrillas. Este esqueleto está embebido en una matriz compuesta de hemicelulosas como material predominante, polisacáridos pécticos y algunas proteínas. Las paredes celulares maduras también contienen lignina como material de incrustación.

Las paredes celulares están formadas por dos tipos de paredes: una pared primaria, fina, y una pared secundaria gruesa (Albersheim, 1965). La pared primaria es la parte de la pared que presentan las células jóvenes, no diferenciadas que están en división y crecimiento. La pared primaria es transformada en pared secundaria durante el período de diferenciación celular, luego que la célula ha cesado su crecimiento. La Figura 7 muestra los principales rasgos estructurales: la sustancia intercelular, la pared primaria, la capa externa de la pared secundaria, la capa media, a la que corresponde el mayor volumen de la pared, la capa interna y los espacios intercelulares. La combinación de rigidez y resistencia que es requerida en los vegetales superiores está provista por esa estructura de varias capas y lamelas de las paredes celulares.

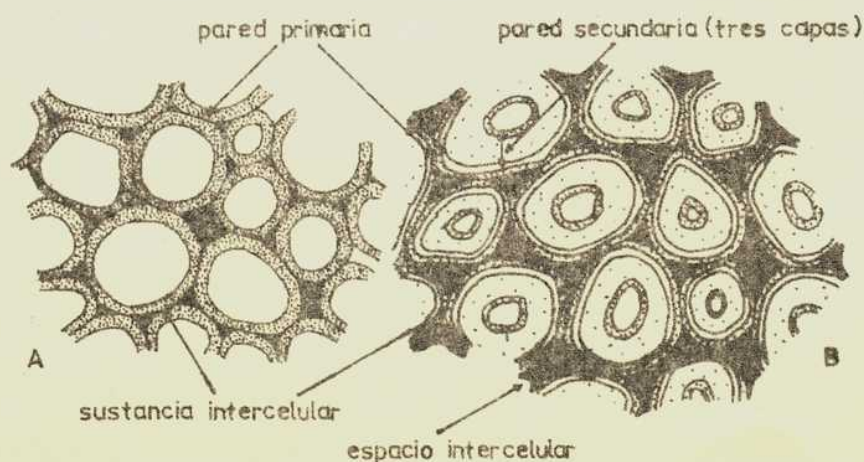


Figura 7. Forma y estructura de la pared de células parenquimáticas. (Corte transversal). Las células en crecimiento (A) presentan sólo pared primaria; en las células maduras (B) se observa la pared secundaria. El contenido celular ha sido omitido.

La pared primaria de una gran variedad de vegetales superiores parecen tener rasgos principales en común y pueden, de hecho, tener estructuras muy similares. Esto no es cierto para la pared secundaria donde la composición y la ultraestructura varían considerablemente de un tipo de célula a otro. De ahí que los estudios efectuados hasta el momento sobre la estructura molecular de las paredes celulares se refieran a células que contienen pared primaria solamente; y por lo tanto en este capítulo se tratarán los aspectos relacionados fundamentalmente con las paredes primarias.

COMPOSICION QUIMICA

La celulosa, las hemicelulosas, los polisacáridos pécticos, las proteínas estructurales y la lignina, han sido identificados como los componentes principales de las paredes celulares de los vegetales superiores.

La pared celular no es una mezcla al azar de los polisacáridos (Nevins y col., 1967) sino que su composición está marcadamente controlada tal como lo indican las diferencias entre la pared primaria y la secundaria.

Celulosa

Las moléculas de glucanos lineales de la celulosa presentan un peso molecular bajo y no uniforme en la pared primaria y mucho más alto y uniforme en la pared secundaria. Estas moléculas están unidas entre sí por uniones hidrógeno. La unión entre aproximadamente 40 cadenas de glucanos constituye una red de fibras de 35 Å de diámetro denominada fibrillas elementales. En las paredes secundarias, esas fibrillas muy elongadas se encuentran formando un agregado de 150 a 250 Å de diámetro denominado microfibrillas.

En la pared primaria las fibrillas de celulosa han sido descritas como consistentes en un "core" cristalino altamente ordenado, rodeado de una zona no cristalina formada por moléculas de celulosa depositadas aisladamente, polisacáridos no celulósicos y glicoproteínas.

Polisacáridos no celulósicos

Los polisacáridos pécticos, presentes en una concentración del 1 a 4 %, están localizados fundamentalmente en la pared primaria y en la sustancia intercelular. Las hemicelulosas se encuentran tanto en la pared primaria como en la secundaria.

La mayor parte de la pared primaria consiste en el material amorfo, extraordinariamente denso, que rodea las fibrillas de celulosa (Albersheim, 1965), y los polisacáridos no celulósicos son los agentes de cementado que mantienen las fibrillas unidas. Estos polisacáridos

están constituidos por polímeros lineales que se encuentran presentes en todos los niveles de desarrollo y por polisacáridos altamente ramificados que son depositados en determinadas etapas del crecimiento celular. La estructura de esos polisacáridos varía de vegetal a vegetal y es interesante destacar que, a pesar de que las variaciones en los componentes cristalinos o fibrilares está confinada a los vegetales inferiores, las variaciones en la composición de los polisacáridos no celulósicos y de los materiales de incrustación, son características de los vegetales superiores. Esto se hace evidente a través de las diferencias sustanciales observadas en la composición de las hemicelulosas y lignina de las Gimnospermas y las Angiospermas (Timell, 1964, 1965).

Las propiedades físicas de las paredes celulares dependen fundamentalmente de las interacciones entre los distintos polímeros componentes.

La Tabla 17 muestra la composición en monosacáridos encontrada por hidrólisis ácida total de las paredes celulares aisladas de distintas especies (paredes primarias).

Tabla 17. Composición en monosacáridos de las paredes celulares primarias (moles %).

Monosacáridos	Monocotiledóneas						
	^a Triticum vulgare	^a Avena sativa	^a Oryza sativa	^a Saccharum officinalis	^a "Brone grass"	^a Lolium perene	^f Aleurona de Hordeum vulgare
Ramposa	0,7	1,2	2,3	0,8	1,7	0,7	0
Arabinosa	25,8	26,1	34,0	31,6	35,7	24,3	32,7
Fucosa	0,1	1,8	1,1	0,3	Tr	0	0
Xilosa	30,9	28,9	21,5	34,0	33,5	23,7	56,9
Manosa	1,0	0,9	0,3	0,5	0,1	0,1	0,2
Galactosa	12,2	13,7	7,2	9,6	9,5	5,8	0,9
Glucosa no celulósica	4,0	5,4	5,4	4,3	4,2	26,4	2,6
Glucosa celulósica	14,2	11,0	11,3	9,4	8,9	12,7	6,9
Acidos urónicos	11,2	11,1	17,0	9,6	6,4	6,3	09

Monosacáridos	Dicotiledóneas					Gimnospermas	
	^e Acer pseudoplatanus	^d Camellia sinensis	^d Malus silvestris	^b Nicotiana tabacum	^c Populus tremula	^a Pino "Douglas"	^d Ginkgo biloba
Ramposa	3,9	ND	3,1	5,4	ND	3,5	ND
Arabinosa	28,2	24,4	48,9	13,5	19,6	19,4	22,7
Fucosa	1,7					1,4	
Xilosa	10,2	34,1	24,0	5,4	17,8	7,7	18,2
Manosa	0,3	ND	2,7	ND	2,1	0,6	Tr
Galactosa	14,5	29,3	12,4	21,6	24,6	9,5	13,6
Glucosa no celulósica	4,2					9,9	
Glucosa celulósica	24,0	12,2	8,9	54,1	35,6	27,4	45,5
Acidos urónicos	13,2					20,7	

^a Burke y col. (1974).
^b Wilson (1959).
^c Suflize (1957).
^d Lamport (1965).
^e Talmadge y col. (1973).
^f McNeill y col. (1975).
^g No se detectó dentro de los límites del método usado (<1,5 %, en peso).

Lignina

La lignina es un polímero complejo y amorfo formado por oxidación acoplada de unidades de alcohol coniferílico (Freudenberg, 1965), y existe suficiente evidencia de que una gran parte de la lignina está combinada químicamente con las hemicelulosas (Merewether, 1957) en los materiales lignificados. Como la lignina es un componente característico de las paredes secundarias, no será incluida en las consideraciones subsiguientes.

Proteínas estructurales

(Ver Proteínas estructurales, página 17 y Glicoproteínas de paredes celulares, página 21).

E S T R U C T U R A M O L E C U L A R

La estructura de las paredes celulares de los vegetales ha sido siempre objeto de intenso estudio. Sin embargo, a pesar de que los componentes de las mismas han sido identificados y estudiados con considerable detalle (ver Polisacáridos, pág. 7 y Proteínas estructurales, pág. 17), no existen antecedentes previos a los estudios iniciados en el año 1973 por Albersheim (Talmadge y col., 1973) que proporcionen un cuadro claro y completo sobre la estructura molecular de las paredes celulares de los vegetales.

Para este tipo de estudio es necesario no sólo resolver los componentes de las paredes celulares en los distintos polímeros de composición, tipo de unión, tamaño y secuencia definidos, sino que es fundamental establecer las interacciones entre dichos polímeros. Las dificultades inherentes a estos análisis se deben a dos grandes factores: (a) variaciones en la preparación de los polisacáridos debidas a la polidispersidad natural, los cambios que pueden ocurrir en los polisacáridos según el estado de desarrollo celular, las diferencias entre los polisacáridos depositados en las distintas capas de la pared celular, y la naturaleza heterogénea de la mayoría de los tejidos que contienen células de diferentes tipos y que tienen paredes celulares de composición variada; (b) métodos de aislamiento (ver Extracción de los polisacáridos, pág. 43).

Las investigaciones llevadas a cabo por Lamport (1965, y referencias allí citadas) sobre glicoproteínas de paredes celulares de vegetales superiores (ver Glicoproteínas de paredes celulares) le condujeron a proponer la hipótesis de que las paredes celulares contienen una malla de proteína-polisacárido análoga a la red de péptido-glicanos de las paredes celulares de las bacterias. Esta hipótesis fue posteriormente comprobada por el mismo Lamport (1967, 1969) trabajando con cultivos

de una suspensión de células de Acer pseudoplatanus y Lycopersicon esculentum; encontró residuos de hidroxiprolina unidos O-glicosídicamente a oligosacáridos de bajo peso molecular pertenecientes a los polisacáridos de la pared celular. Estos oligosacáridos son probablemente el comienzo de cadenas más grandes de polisacáridos, que por alguna razón resultaban lábiles al álcali en la zona de dos a cuatro unidades de arabinosa con respecto al punto de unión con la hidroxiprolina. Esta suposición fue confirmada por el aislamiento de las paredes celulares de pericarpio de maíz, de un complejo polisacárido-proteína rico en hidroxiprolina (Boundy y col., 1967).

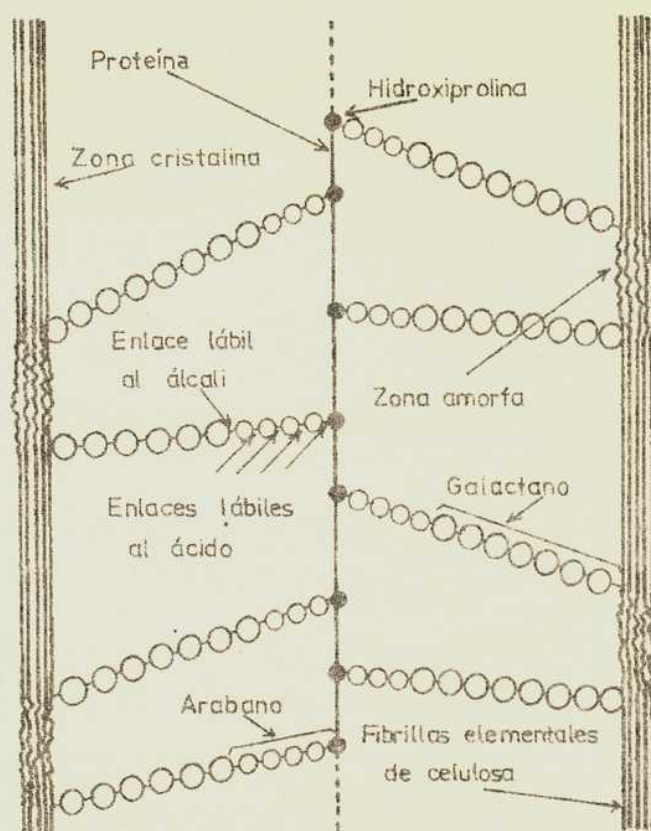


Figura 8. Esquema hipotético para el complejo extensina-polisacárido.

La Figura 8 es un esquema hipotético del ordenamiento de este complejo proteína-polisacárido de las paredes celulares. Las cadenas laterales del polisacárido probablemente contienen un galactano con ramificaciones de oligosacáridos de arabinosa de bajo peso molecular. Estos oligosacáridos están unidos glicosídicamente a la hidroxiprolina. Las moléculas de proteínas pueden entrecruzarse a través de puentes disulfuros para aumentar la coherencia y la resistencia a la extensión de la pared (Lamport, 1965). La ruptura de la red provee las sustancias pécticas solubles en ácido y las hemicelulosas solubles en álcali. Dado que las uniones L-arabinofuranósicas son rápidamente hidrolizadas bajo condiciones débilmente ácidas, la extracción con ácidos diluidos en caliente permite obtener las sustancias pécticas; el tratamiento

con álcali, sin embargo, rompe el enlace entre la arabinosa y los otros polisacáridos, liberando las hemicelulosas.

Utilizando el hecho de que las paredes celulares pueden ser fragmentadas en forma mucho más satisfactoria mediante el uso de enzimas hidrolíticas purificadas, Talmadge y col. (1973) aislaron fragmentos definidos sobre los que efectuaron los estudios estructurales. Para dicho estudio seleccionaron las paredes celulares aisladas de un cultivo de una suspensión de células de una *Aceraceae* (*Acer pseudoplatanus*), conocida como sicámore, debido a que es un cultivo de tejido homogéneo, las células son aisladas antes de que se inicie el engrosamiento y la lignificación, y además secretan al medio polisacáridos de composición similar a los polisacáridos no celulósicos de la pared y estructuralmente relacionados con los mismos (Bauer y col., 1973). La importancia de este trabajo reside precisamente en la elección de células que poseen pared primaria únicamente, y el uso de enzimas hidrolíticas purificadas para aislar los fragmentos de la pared celular constituidos por polisacáridos y glicoproteínas.

A continuación se detallan los resultados más importantes obtenidos en el fraccionamiento y análisis estructural de los componentes, y las conclusiones derivadas de los mismos que le permitieron proponer a estos autores (Talmadge y col., 1973; Bauer y col., 1973; Keegstra y col., 1973) un modelo estructural para las paredes primarias. Por razones de espacio se han omitido los resultados obtenidos en el análisis por metilación.

Determinación de la estructura molecular de las paredes celulares primarias

La composición en monosacáridos de las paredes celulares está indicada en la Tabla 17. Los monosacáridos componentes de los polisacáridos no celulósicos constituyen el 63 % de la pared. El resto corresponde a la celulosa (23 %) y a la proteína (10 %). Los estudios de metilación efectuados sobre las paredes celulares enteras y sobre las fracciones obtenidas por la acción de las enzimas hidrolíticas, demostraron que las paredes celulares del sicámore están formadas por un número limitado de polímeros: un arabano (10 %), un β -(1 \rightarrow 4)-galactano (8 %), un ramnogalacturonano (16 %), un xiloglucano (21 %) y una proteína rica en hidroxiprolina (10 %, tetra-arabinósidos unidos a la hidroxiprolina, 9 %), junto con pequeñas cantidades de un 3,6-arabinogalactano (2 %) y la celulosa (23 %).

La estructura de las sustancias pécticas se determinó (Talmad-

ge y col., 1973) por estudio de los fragmentos liberados por la acción de una endopoligalacturonasa. Esta enzima, que degrada específicamente la zona de los galacturonanos de las sustancias pécticas, liberó un 16% de la pared celular como material soluble (fracción PG; la composición en monosacáridos de ésta y las demás fracciones mencionadas, figura en la Tabla 18). Este material constituye el 50 % del total de las sustancias pécticas y contiene el 75 % del ácido galacturónico de la pared. Por fraccionamiento sobre Bio-Gel P-2 se determinó que está formado por material polimérico (fracción PG₁, 26 % de ácido galacturónico y 74 % de azúcares neutros) y por cantidades aproximadamente iguales de ácidos tri-, di- y monogalacturónico (fracción PG₂).

El análisis de las fracciones PG₁ y PG₂, y de los oligómeros de ácido galacturónico, obtenidos por hidrólisis ácida parcial de las paredes, permitió proponer una estructura tentativa para el ramnogalacturonano (Figura 9).

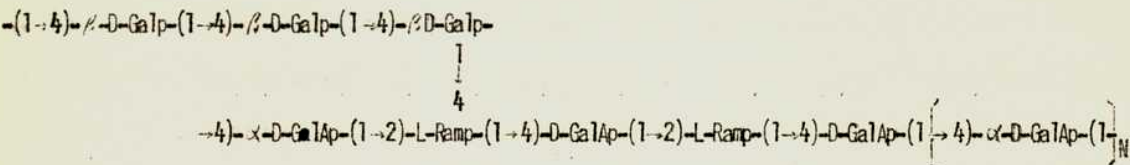


Figura 9. Estructura propuesta para el ramnogalacturonano. N, número no determinado, probablemente entre 4 y 10.

Tabla 18. Composición en monosacáridos de las fracciones aisladas de las paredes celulares de *Acer pseudoplatanus* (moles %).^a

Monosacárido	PG	PG ₁	PG ₂	PG _{1B}	U	C ₁	C ₂	B	E	B ₁	B ₂	PR	PR ₁	PR ₂
Ramnosa	4,2	12,5	0,7	14,0	3,5	1,4	4,6	5,6	0,1	0	8,7	7,8	0	14,4
Arabinosa	16,8	33,2	4,1	32,7	16,1	9,1	37,4	20,1	1,8	6,5	23,6	71,8	93,0	40,6
Fucosa	0	1,0	0	0,5	3,0	6,6	1,0	2,1	5,2	4,5	2,2	0,3	0	1,2
Xilosa	1,0	2,3	0	1,5	21,7	35,8	2,9	18,0	34,0	36,7	14,0	2,6	0	2,2
Manosa	0,1	0	0	0	1,6	0,9	0,4	0	1,3	0	0	1,2	0	0
Galactosa	13,8	23,0	3,8	24,9	18,3	14,4	42,4	21,0	7,9	10,3	22,0	14,0	3,5	19,2
Glucosa	2,8	2,3	0	2,5	28,3	30,4	4,0	19,5	48,4	36,9	11,7	2,4	3,5	2,9
Acido galacturónico	61,5	26,0	91,5	24,0	7,6	2,4	7,5	13,5	11,5	15,0	17,8		0	20,4

^a Talmadge y col. (1973); Bauer y col. (1973); Keegstra y col. (1973).

La degradación de la cadena del galacturonano por la endopoligalacturonasa demostró que los enlaces glicosídicos son de configuración α y que los oligómeros no contienen menos de cuatro unidades (English y col., 1972). Los perfiles de elución sobre Bio-Gel P-30 y Bio-Gel P-2 indicaron que la zona lineal del galacturonano contiene entre seis y doce unidades (Bauer y col., 1973).

Los polisacáridos acídicos de la fracción PG₁ (fracción PG_{1B}) se obtuvieron por cromatografía sobre DEAE-Sephadex A-25, y por hidrólisis ácida parcial de los mismos y análisis de los productos, se determinó la estructura del arabano y del galactano. Los resultados indi

caron que el 85 % de las unidades arabinosílicas fueron liberadas por hidrólisis del fragmento ácido del ramnogalacturonano, mientras que el 75 % de las unidades galactosídicas permanecen unidas al mismo. Estos datos, sumados a los obtenidos por metilación, sugirieron para el galactano una estructura lineal formada por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-galactopiranosas y unida por su extremo reductor a la cadena principal del ramnogalacturonano, y una estructura ramificada para arábano. No se pudo determinar si este último está unido al galactano o directamente al ramnogalacturonano.

La fracción PG_{1B} mostró además la presencia de pequeñas cantidades de un xiloglucano unido covalentemente al galactano, y como éste a su vez está unido covalentemente al ramnogalacturonano, serviría como puente de unión entre ambos polisacáridos. El punto de unión entre el xiloglucano y el galactano no ha sido determinado; dado que la mitad de las unidades ramnosílicas están ramificadas en O-4, es probable que éste sea el sitio de unión del galactano (Figura 9).

Las estructuras propuestas para las sustancias pécticas de las paredes celulares del sicámoro, son en general consistentes con otros estudios previos (ver Polisacáridos estructurales: Sustancias pécticas, pág. 7).

La estructura de la hemicelulosa se determinó (Bauer y col., 1973) mediante el aislamiento y caracterización del xiloglucano remanente en las paredes celulares tratadas con la endopoligalacturonasa. Para ello se estudiaron las fracciones liberadas por tratamiento con urea 8 M (fracción U), con hidróxido de sodio 0,5 N (fracción B) y con una endoglucanasa. Estas a su vez fueron fraccionadas en polisacáridos neutros (fracciones C₁ y B₁) y ácidos (fracciones C₂ y B₂) por cromatografía sobre DEAE-Sephadex A-25. Paralelamente se estudió el xiloglucano aislado de los polisacáridos extracelulares (fracción E) y se encontró suficiente evidencia de la presencia del mismo tipo de xiloglucano en las paredes celulares.

En efecto, las fracciones U, B y la obtenida por acción de la endoglucanasa son muy similares entre sí y poseen los mismos tipos de unión y composición que el xiloglucano extracelular (fracción E). Además se observó que estos polisacáridos muestran la misma facilidad que el xiloglucano extracelular para formar uniones no covalentes con la celulosa y complejos con el iodo, y que los fragmentos del xiloglucano, obtenidos por hidrólisis exhaustiva de la fracción C₁ con endoglucanasa, presentan los mismos perfiles de elución sobre Bio-Gel P-2 que los correspondientes oligómeros de la fracción E. Estos resultados in-

dican que los xiloglucanos de ambas fuentes son virtualmente iguales.

La estructura del xiloglucano (Figura 10) consiste básicamente en una cadena de unidades de D-glucosa enlazadas por uniones β -(1→4)- con ramificaciones de D-xilosa en posición β -(1→6)- en tres de cada seis unidades de glucosa. Esta estructura guarda una estrecha similitud con los xiloglucanos de semillas que han sido ampliamente estudiados (ver Amiloides, pág. 6).

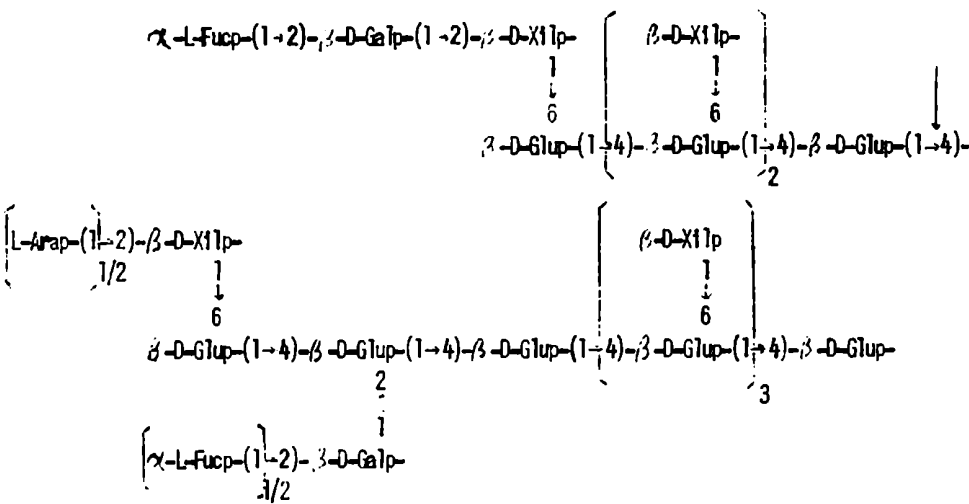


Figura 10. Estructura propuesta para el oligosacárido del xiloglucano de mayor peso molecular. La flecha indica los puntos de unión resistentes a la endoglucanasa.

Los resultados obtenidos permitieron a Bauer y col. (1973) proponer la unión no covalente del xiloglucano con las fibrillas elementales de celulosa y la existencia de uniones covalentes con las sustancias pécticas, ya mencionada, en base al análisis de las fracciones U, B y C₂ que contienen cantidades significativas de ramnosa, arabinosa, galactosa y ácido galacturónico. La función estructural de los polisacáridos hemicelulósicos sería la de interconectar las fibrillas y las sustancias pécticas; esta función estaría basada en la habilidad de los mismos en unirse no covalentemente a la celulosa (Blake y Richards, 1971 a; Grant y col., 1969) y covalentemente, a través de las uniones glicosídicas de sus extremos reductores, a los polisacáridos pécticos. A este respecto, Keegstra y col. (1973) encontraron evidencia adicional al analizar las fracciones B₁ y B₂. La fracción B₁ (polisacáridos neutros) consiste casi exclusivamente en xiloglucanos; en cambio la fracción B₂ contiene los azúcares característicos de los fragmentos pécticos ricos en monosacáridos neutros (ramnosa, arabinosa, galactosa y ácido galacturónico) de la fracción PG₁, y los azúcares característicos del xiloglucano (fucosa, xilosa, galactosa y glucosa). Los estudios de metilación confirmaron estos resultados. Además determinaron que la estructura corresponde a la unión del extremo reductor del xiloglucano con los polisacáridos pécticos.

La glicoproteína estructural de las paredes celulares de Acer

pseudoplatanus fue estudiada por Heath y Northcote (1971, ver Glicoproteínas de paredes celulares, pág. 21) y encontraron que es rica en hidroxiprolina (la hidroxiprolina constituye el 2 % de la pared celular y el 20 % de los aminoácidos totales) y contiene una alta proporción de arabinosa y galactosa. Keegstra y col. (1973) examinaron la naturaleza del enlace entre los polisacáridos de la pared y esta proteína estructural. Para ello hicieron uso de enzimas proteolíticas y observaron que cuando las paredes celulares enteras eran tratadas con pronasa, sólo se liberaba menos del 0,3 % de los hidratos de carbono totales de la pared como material soluble. En cambio, si se utilizaban paredes celulares tratadas previamente con la endopoligalacturonasa, se solubilizaba más del 2 % de los hidratos de carbono totales y este porcentaje se incrementaba hasta cerca del 4 % si además las paredes celulares habían sido degradadas con la endoglucanasa. Estos resultados indicaron que los hidratos de carbono de la glicoproteína estructural estaban unidos a los polisacáridos de la pared.

Los glicopéptidos obtenidos en este último caso presentaron la composición indicada en la Tabla 18 (fracción PR), y los datos resultaron consistentes con lo supuesto previamente. Para el estudio estructural fueron previamente fraccionados por cromatografía sobre DEAE-Sephadex A-25 y los resultados obtenidos mostraron que la fracción que no posee polisacáridos acídicos (fracción PR₁), presenta sólo un 5,4 % de hidratos de carbono (2,1 % de la pared celular) junto con restos hidroxiprolínicos. El azúcar predominante es la arabinosa que deriva presumiblemente de los oligosacáridos unidos glicosídicamente a la hidroxiprolina, tal como fuera determinado por Lamport (1969). A diferencia de lo encontrado para la fracción PR₁, la fracción que contiene los polisacáridos acídicos (PR₂) posee un 95 % de hidratos de carbono (1,7 % de la pared celular) y es en composición y tipos de enlaces, similar a los fragmentos pécticos de las fracciones PG_{1B} y C₂. Dado que los fragmentos pécticos de la fracción PR₂ fueron liberados por la acción de una proteasa, es evidencia de la existencia de una unión entre las sustancias pécticas y la proteína.

Los datos obtenidos, si bien no permiten determinar el tipo de unión, concuerdan con la hipótesis de que los polisacáridos pécticos están unidos a la proteína por medio de cadenas cortas de arabinogalactanos, similares a los encontrados para la glicoproteína de los polisacáridos extracelulares. En ambos tipos de productos se determinaron péptidos que contienen hidroxiprolina y una alta proporción de unidades galactosídicas sustituidas en O-3 y en O-3 y O-6 simultáneamente; estos arabinogalactanos servirían como puente de unión entre el ramno-

galacturonano y la proteína rica en hidroxiprolina. En base a estos resultados y a los informados por Lampert (1969), las posibilidades de unión serían a través del enlace entre el 3,6-arabinogalactano y la serina de la proteína (Lampert y col., 1973), y/o el enlace lábil al álcali entre el tetra-arabinósido unido glicosídicamente a la hidroxiprolina y las sustancias pécticas (por ejemplo, un grupo éster entre el hidroxilo de una unidad arabinosilica y el carboxilo del ramnogalacturonano). Hasta el presente los autores no han dilucidado entre ambos tipos de uniones.

Los resultados presentados pueden ser resumidos en términos de un modelo estructural para las paredes celulares del sicámero. Si bien otras estructuras son posibles, la aquí descrita es consistente con todos los datos obtenidos. El modelo no intenta ser cuantitativo, pero en general (Figura 11) los componentes de la pared aparecen representados

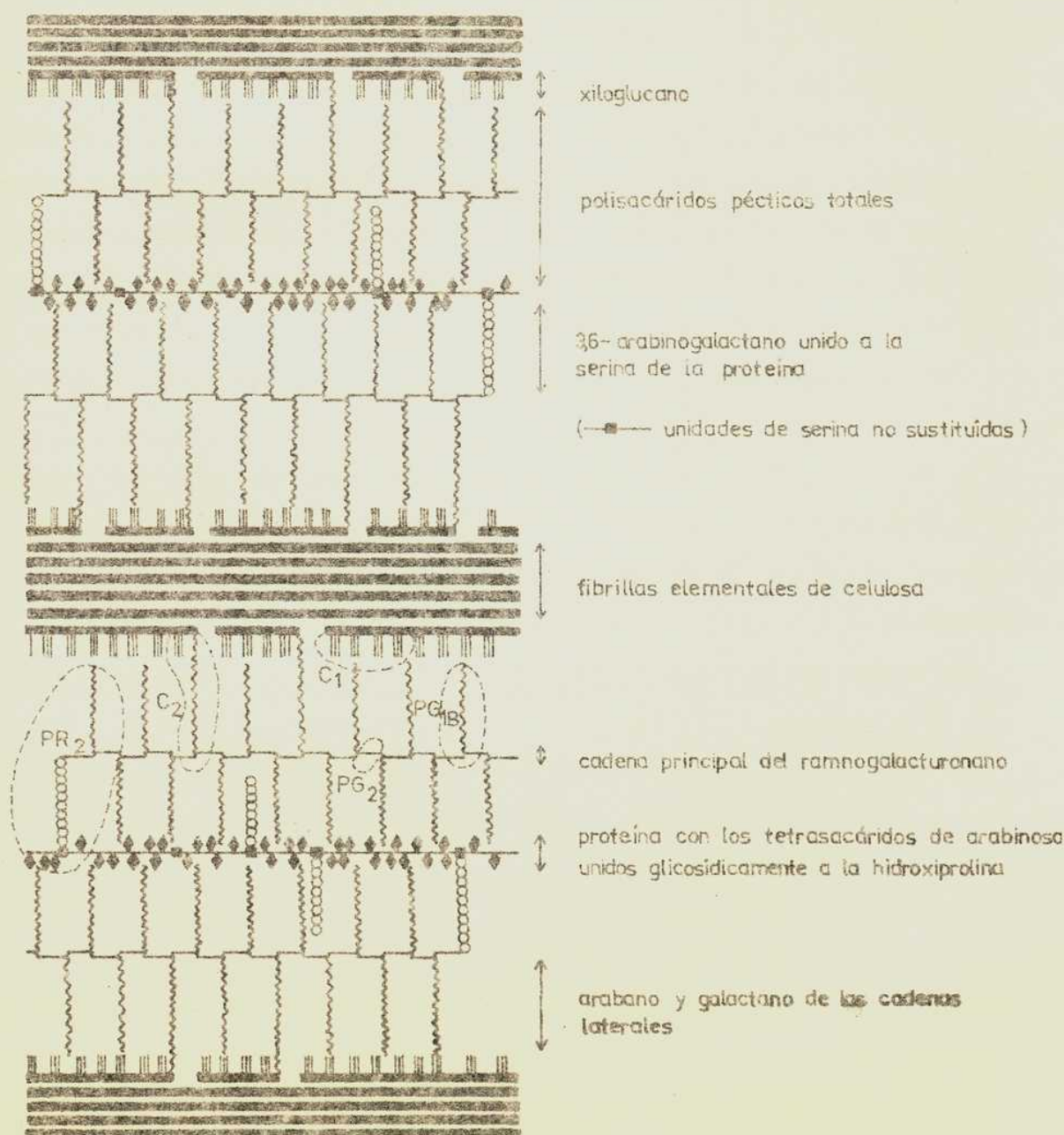


Figura 11. Estructura propuesta para las paredes celulares de *Agar sesquialgatus*. Las áreas indicadas representan las fracciones liberadas por las enzimas degradativas: PG₁ y PG₂ por la endonogalacturonasa; C₁ y C₂ por la endoglucanasa; y PR₂ por la pectinasa.

dos en las proporciones apropiadas. La distancia entre las fibrillas elementales de celulosa ha sido expandida para mostrar las interconexiones entre los polímeros.

El modelo utiliza el hecho de que el xiloglucano puede estar estrechamente unido a la celulosa y que los extremos reductores del mismo están enlazados a las cadenas de galactanos del ramnogalacturonano. Esta estructura hipotética muestra como las sustancias pécticas están unidas a la serina de la proteína de la pared a través del 3,6-arabinogalactano.

Por otra parte, esta estructura permite explicar la naturaleza de los fragmentos liberados por cada tipo de enzima: la endopoligalacturonasa hidroliza los enlaces glicosídicos de la cadena péctica principal liberando los ácidos tri-, di- y monogalacturónico (fracción PG₂) y las cadenas de arabinos y galactanos unidas a los fragmentos ácidos de la cadena principal (fracción PG_{1B}); una vez que las sustancias pécticas han sido parcialmente degradadas, la endoglucanasa libera con mayor facilidad el xiloglucano para dar lugar a los oligosacáridos neutros (fracción C₁) y los fragmentos pécticos que permanecen insolubles por su unión con el xiloglucano (fracción C₂); la pronasa, que no puede liberar hidratos de carbono de las paredes celulares sin degradar, está en condiciones de liberar fragmentos pécticos luego del tratamiento con la endopoligalacturonasa y mayores cantidades de hidratos de carbono luego del tratamiento con la endoglucanasa (fracción PR₂).

La pared celular primaria de las células de Acer pseudoplatanus puede ser considerada como una única macromolécula en la que los componentes, con excepción del xiloglucano y la celulosa, están unidos covalentemente, y las numerosas uniones hidrógeno entre éstos le confieren la fuerza de una unión covalente.

Si bien es difícil comparar las estructuras de los componentes de la pared aquí descriptos con los de la literatura, en razón de la amplia variedad de procedimientos de preparación utilizados y la heterogeneidad de las fracciones extraídas químicamente, existen rasgos estructurales específicos de las paredes celulares del sicámore que parecen ser comunes a otras especies relacionadas o distantes dentro de los vegetales superiores. La proteína rica en hidroxiprolina y los oligoarabinósidos asociados con ésta, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Lamport, 1970). Kooiman (1960 a) demostró que el xiloglucano se encuentra en las paredes celulares de los cotiledones o del endosperma de numerosos vegetales, y observó la existencia de la

interconexión entre el xiloglucano y las sustancias pécticas en las paredes celulares de los cotiledones de semillas de mostaza. Wilder y Albersheim (1973) determinaron que la estructura básica del xiloglucano de las paredes celulares de Phaseolus vulgaris es la misma que la del xiloglucano de Acer pseudoplatanus. Valente y Albersheim (1974) presentaron evidencia adicional con respecto a la fuerte unión entre la hemicelulosa y la celulosa, y en especial en su relación con la elongación de la célula. Grant y col. (1969) aislaron de los brotes de semillas de mostaza una partícula soluble que representaría una unidad estructural de la pared celular.

Por otra parte, se observaron variaciones en los polisacáridos que componen la estructura de la pared celular. Es sabido que otras clases de hemicelulosas (Blake y Richards, 1971 a) pueden unirse a la celulosa y reemplazar al xiloglucano en su función estructural, por ejemplo, el arabinoxilano aislado de las paredes celulares de la aleurona de cebada (Hordeum vulgare, McNeil y col., 1975). Burke y col. (1974) estudiaron las paredes celulares de seis monocotiledóneas y una gimnosperma siguiendo las técnicas descritas por Talmadge y col. (1973). Los resultados obtenidos en cuanto a la composición en monosacáridos (Tabla 17), proteína e hidroxiprolina (Tabla 14) y los estudios de metilación, mostraron que las paredes celulares de las monocotiledóneas contienen los mismos tipos de polímeros (a pesar de provenir de distintos tejidos) y son sustancialmente diferentes de los de la dicotiledónea (Acer pseudoplatanus) y de la gimnosperma (pino "Douglas"); el arabinoxilano es el componente principal (40 %), junto con celulosa (9 a 14 %), ácidos urónicos (7 a 18 %) y proteína (7 a 17 %, la hidroxiprolina representa menos del 0,2 % de la pared), y sólo una de ellas (Lolium perenne) posee cantidades apreciables de β -(1 \rightarrow 3)- y β -(1 \rightarrow 4)-glucanos.

EXTRACCION DE LOS POLISACARIDOS

GENERALIDADES

Los procedimientos de extracción y fraccionamiento de los polisacáridos pueden ser, en muchos casos, complejos. Para algunos tipos de polisacáridos el aislamiento involucra un procedimiento simple, generalizado y reproducible, como por ejemplo la extracción con agua de los galactomananos. En otros casos, como los polímeros de las paredes celulares de los vegetales, los distintos polisacáridos componentes son extraídos con una variedad de solventes, después de uno o más pre-tratamientos, y son luego fraccionados por diversos métodos.

Comunmente el análisis de los polisacáridos de tejidos vegetales es precedido por la desintegración y la extracción con etanol 80 % en caliente, seguido de secado. Este procedimiento remueve los azúcares y otros compuestos de bajo peso molecular, inactiva las enzimas y provee un adecuado material de partida para los análisis posteriores. La mayoría de los métodos disponibles para el fraccionamiento y aislamiento de los distintos constituyentes de las paredes celulares, usan el residuo insoluble en alcohol (o acetona) o el residuo libre de extraer con alcohol-benceno como material de partida, y a pesar de que se puede obtener información muy útil sobre dichos constituyentes con este residuo, presenta serias desventajas. Por ejemplo, las proteínas citoplasmáticas, ácidos nucleicos y polisacáridos de reserva son co-precipitados con los residuos, en adición con algunos compuestos de bajo peso molecular como polifenoles y ésteres fosfato. La contaminación con proteínas citoplasmáticas puede variar del 5 al 40 % de su peso, dependiendo del tipo y madurez del tejido; esta contaminación es considerable comparada con el contenido en proteínas de estos tejidos (2 a 6 % en peso de la pared celular). Estos co-precipitantes alteran los pesos relativos de los varios grupos de polisacáridos de las paredes celulares y tienden a oscurecer completamente el significado y tipo de proteínas de paredes celulares asociadas con los mismos (Selvendran, 1975). Además se ha encontrado que las preparaciones de paredes celulares secas pueden requerir un tratamiento especial de rehidratación para que pueda lograrse una extracción satisfactoria de los polisacáridos (Knee, 1971), siendo conveniente la extracción de los tejidos frescos.

El estudio de las paredes celulares involucra una serie de extracciones de severidad creciente, seguidas de la detección y estimación de los monosacáridos componentes de los extractos. Los procedi-

mientos de extracción han sido derivados empíricamente y la carencia de conocimientos sobre la organización de la pared celular, hace que la interpretación de los resultados sea, en cierto modo, subjetiva.

Los polisacáridos no celulósicos han sido definidos operacionalmente por su presencia en las fracciones obtenidas mediante extracciones químicas consecutivas. Las dos mayores fracciones son (ver Polisacáridos estructurales, pág. 7): los polisacáridos pécticos, obtenidos por extracción con agua a ebullición, EDTA o ácido diluido (Aspinall, 1970; Worth, 1967), y las hemicelulosas, solubilizadas por la subsecuente extracción con álcali (Timell, 1964, 1965; Whistler y Richards, 1970).

EXTRACCION ALCALINA

Las hemicelulosas son extraídas, por lo general, luego de eliminar los lípidos y la lignina. Dado que la lignina actúa como agente de cementado en las paredes celulares (Neish, 1965), su remoción expone a las hemicelulosas a la fácil disolución en álcali y permite el aislamiento de las hemicelulosas puras (Rogers y col., 1947) en aquellos casos en que la proporción de lignina es considerable (por ejemplo, hemicelulosas de maderas). Los lípidos son eliminados con una mezcla azeotrópica de benceno: etanol en caliente. (Kurth, 1939). Las concentraciones de álcali usadas para el aislamiento de las hemicelulosas varían del 2 al 18 %, pero lo común es el 10 %. Si las sustancias pécticas están presentes en gran proporción (como en el caso de las legumbres para forraje), frecuentemente contaminan las hemicelulosas obtenidas por el procedimiento convencional, y, por lo tanto, la extracción de las hemicelulosas debe llevarse a cabo luego de remover los polisacáridos solubles en agua y las sustancias pécticas (Blake y Richards, 1971 a). La falta de definición entre los distintos tipos de polisacáridos y la posibilidad de superposición entre las sustancias pécticas y las hemicelulosas, contribuyen a las dificultades en la interpretación de los resultados.

En base a lo expuesto se deduce que la extracción alcalina de las hemicelulosas implica la consideración de dos factores: (a) la eliminación de la lignina, y (b) la caracterización precisa de las fracciones obtenidas, a saber, las sustancias pécticas y las hemicelulosas. a) El método comunmente empleado para la remoción de la lignina (Whistler y col., 1948) es el tratamiento del material con clorito de sodio acidificado (ácido cloroso) a 70-75 C. El cloro también es usado en la deslignificación. El material obtenido se conoce como holocelulosa. Los tejidos de plantas anuales se convierten en holocelulosas más rápi-

damente que las maderas, debido, posiblemente, al menor contenido en lignina.

La deslignificación suele producir degradaciones en las hemicelulosas. Así por ejemplo, los extremos reductores son oxidados a ácidos aldónicos y puede ocurrir la despolimerización y la oxidación de los grupos 2,3-glicólicos. Es importante notar asimismo que, luego de la deslignificación, el fraccionamiento de los polisacáridos de los tejidos vegetales puede tener valor limitado en términos de la matriz de polímeros "in vivo".

En consecuencia, Monro y col. (1974) sugirieron que cuando el contenido en lignina es bajo, la deslignificación es innecesaria. Además cuando se trabaja con paredes celulares primarias (hasta un 3 a 5 % de lignina), la lignina no se tiene en cuenta (Talmadge y col., 1973) dado que es un componente característico de las paredes secundarias. A este respecto, Gaillard y Bailey (1968) trabajando con paredes celulares de hojas y tallos jóvenes de trébol (Trifolium pratense) caracterizados por su bajo contenido en lignina, examinaron el efecto de una deslignificación suave sobre el procedimiento de extracción y fraccionamiento. Para controlar dicho efecto, los residuos de las paredes celulares obtenidos por extracción con detergente neutro de Van Soest, fueron tratados con cloramina-T y etanolamina. El remanente se extrajo con álcali 10 %, y 24 % junto con ácido bórico 4 %, y se determinó el contenido en galactosa y manosa en el residuo final, obteniéndose un 91 % y un 85 %, respectivamente, del porcentaje presente en el residuo no deslignificado. Se dedujo, entonces, que el método de deslignificación usado no mejoraba considerablemente el procedimiento de extracción.

Por otra parte, se ha encontrado que la deslignificación remueve grandes cantidades de arabinosa y galactosa de las paredes celulares de hipocotilos de Lupinus albus (Monro y col., 1972). La confirmación de la pérdida debida, parcialmente, a las condiciones ácidas usadas en el proceso (pH 2,0 a 3,9) y a la ruptura de los enlaces glicosídicos furanósicos, se llevó a cabo determinando la composición en monosacáridos producidos por hidrólisis ácida de las paredes celulares despectinizadas, antes y después de la deslignificación con ácido acético-cloramina T. Los porcentajes de monosacáridos extraídos en este último caso, respecto de la pared celular total, fueron los siguientes: arabinosa 95 %, galactosa 70 %, xilosa 30 %, manosa 20 % y glucosa 15%. El ácido acético a la concentración y pH usados, causa la solubilización preferencial similar, aunque algo menor, de la arabinosa y la galactosa que el método de Whistler y De Miller (1963) de clorito-ácido

acético (pH 4,5).

Bailey y Pickmere (1975, y referencias allí citadas) pudieron generalizar, en base a los resultados obtenidos, que en tejidos vegetales inmaduros o de bajo contenido en lignina, su remoción es innecesaria aún cuando las pérdidas sean pequeñas.

b) Las operaciones de degradación relativamente suaves, tales como hervir las paredes celulares con agua o soluciones de EDTA, de hexametafosfato de sodio u oxalato de amonio, solubilizan una "mezcla compleja" de polisacáridos ácidos y neutros. Esos polisacáridos son poliglacturónicos, carboximetilados en diversos grados y contienen bloques de componentes con azúcares neutros (galactosa, glucosa, xilosa, arabinosa, fucosa, etc.). De ahí que los términos clásicos de sustancias pécticas y hemicelulosas (ver Polisacáridos estructurales, pág. 7) no sean lo suficientemente precisos.

Si bien las hemicelulosas se definen como los polisacáridos solubles en álcali, existe una superposición entre las fracciones pécticas y las hemicelulósicas que depende del método de extracción usado, y los términos hemicelulosas y sustancias pécticas describen los métodos mejor que a los polisacáridos obtenidos. Roberts y Loewus (1966) indicaron que "los procedimientos normalmente usados para distinguir entre las sustancias pécticas y las hemicelulosas, dan fracciones de hidratos de carbono con solubilidades características que van de las sustancias pécticas a las hemicelulosas, a pesar de que la composición de esas fracciones (paredes celulares de Acer pseudoplatanus) en ácidos urónicos y pentosas son decididamente las de las sustancias pécticas".

La complejidad de las sustancias pécticas, por otro lado, da lugar a una superposición de las clases solubles en agua y las solubles en álcali, según lo demostrado por Aspinall y Fanshawe (1961) para las pectinas de alfalfa. Estos autores encontraron que los polisacáridos extraídos con agua eran ricos en poliurónicos esterificados, mientras que la siguiente extracción con solución de oxalato de amonio dio, fundamentalmente, ácido péctico, y el tratamiento final con solución de hidróxido de calcio en caliente permitió obtener una mezcla conteniendo arabinosa como el azúcar en mayor proporción.

Los oligosacáridos de L-arabinosa, que representan en muchos casos estudiados (Lamport, 1970, y las referencias allí citadas) el primer grupo de azúcares de las cadenas laterales de los polisacáridos de las paredes celulares, suelen aparecer como sustancias pécticas debido a la facilidad con que los enlaces arabinosílicos son hidrolizados por el ácido diluido caliente (por ejemplo, HCl 0,05 N). En cambio, cuando se usan otros métodos de extracción de sustancias pécticas, la

extracción alcalina subsiguiente libera, por lo general, esas cadenas laterales del polisacárido como hemicelulosas, debido a que el enlace existente entre el oligosacárido de arabinosa y la cadena lateral del polisacárido es, probablemente, lábil al álcali.

Whistler y Gaillard (1961) han señalado la variedad de los procedimientos usados para preparar y aislar las hemicelulosas y la necesidad de uniformar dichos procedimientos a los efectos de hacer posible una evaluación comparativa de las hemicelulosas de diferentes fuentes. Los intentos de Blake y col. (1971) de correlacionar los pastos tropicales con las especies de zonas templadas, resultaron asimismo impedidos debido a la carencia de un método establecido de análisis entre los investigadores de este campo.

Gaillard (1965) observó que la separación de las hemicelulosas en las fracciones A, B y C (ver Hemicelulosas, pág. 8) no es marcada y posteriormente Blake y col. (1971) confirmaron este hecho al estudiar el amplio rango de técnicas de fraccionamiento conocidas; de por sí, la separación por los métodos convencionales ha probado ser notablemente irreproducible. Previamente al tratamiento con álcali, los materiales fueron sujetos a extracción con etanol, agua fría y caliente, y con oxalato de amonio, y deslignificación con clorito. Para superar las variaciones impredecibles, Blake y col. (1971) incluyeron en la separación convencional de las hemicelulosas A, B y C, un tratamiento por calentamiento de la solución durante el fraccionamiento (ver Parte Experimental, Procedimiento 2, pág. 202), y desarrollaron un nuevo método para el aislamiento de las hemicelulosas de los extractos alcalinos que combina la diálisis con el intercambio iónico. El método es simple y más reproducible que la neutralización convencional con ácido acético, y permite la examinación de la hemicelulosa C, usualmente descartada debido a la dificultad de remover las grandes cantidades de acetato de sodio provenientes de la neutralización. Los rendimientos relativos de las hemicelulosas A y B pueden diferir entre ambos métodos en forma notable. Así por ejemplo, se han encontrado en cuidadosos experimentos por duplicado (método convencional), variaciones de hasta el 10 % en el rendimiento promedio de la hemicelulosa A. Estas variaciones no son debidas a fluctuaciones en el campo centrífugo durante la separación de las fracciones, pero parecen estar asociadas con el grado de dispersión o solubilización de las moléculas, y en gran parte resultaron obviadas por el tratamiento por calentamiento.

MODIFICACIONES QUIMICAS PRODUCIDAS DURANTE LA EXTRACCION

La mayor dificultad en el análisis de las estructuras es la de

encontrar los métodos adecuados para el aislamiento de fragmentos definidos. Los métodos clásicos de extracción, que utilizan ácidos o bases, producen la ruptura simultánea, aunque parcial, de varios tipos de uniones presentes entre los polímeros componentes de las paredes celulares. Las uniones glicosídicas, particularmente las de arabinosa, fucosa y ramosa, son susceptibles de hidrólisis en ácido diluido. Este también hidroliza los enlaces éster de los grupos acetilos de los azúcares y los ésteres metílicos de los ácidos urónicos. La falta de especifici-
dad (ver a continuación) hace difícil el determinar como las fracciones extraídas con ácido o álcali están unidas entre sí o con los demás componentes. A falta de métodos de fragmentación más satisfactorios, como por ejemplo el uso de enzimas hidrolíticas purificadas (Talmadge y col., 1973), se utilizan los métodos de extracción tradicionales (que siempre involucren degradaciones) y las estructuras son deducidas a partir de la naturaleza de los productos aislados.

Efectos de la extracción en medio alcalino

Las modificaciones de las hemicelulosas resultantes de la extracción alcalina, respecto a su composición original en los vegetales, se deben principalmente a los siguientes tipos de reacciones:

- a) Desesterificación de los polisacáridos parcialmente acilados, principalmente por grupos acetilos.
- b) Degradación alcalina tipo "peeling": se inicia en el extremo reductor del polisacárido y da lugar a la formación de ácidos sacarínicos, por medio de una reacción de β -eliminación, así como también ácidos dihidroxibutírico, láctico, fórmico y otros de bajo peso molecular (Sowden, 1957) y a la formación de un nuevo extremo reductor. En los polisacáridos que presentan uniones (1 \rightarrow 4)-, la reacción de "peeling", que procede por pasos, es finalizada por una reacción de terminación o por la presencia de puntos de ramificación, por ejemplo uniones (1 \rightarrow 2)- o (1 \rightarrow 3)- (Whistler y Be Miller, 1958), con eliminación de la cadena lateral y del azúcar reductor y reordenamiento simultáneo a un ácido metasacarínico estable al álcali.

La degradación alcalina, que se produce aún en atmósfera libre de oxígeno, es considerablemente reducida y las reacciones de β -eliminación prevenidas si el polisacárido se reduce previamente con borohidruro (Aspinall y col., 1961).

- c) Trans-eliminación de ácidos urónicos: las sustancias pécticas se despolimerizan en medio neutro o alcalino, para dar fragmentos de D-galacturonanos de bajo peso molecular (Figura 12). Los ácidos pécticos libres parecen ser más resistentes que las pectinas y la susceptibili-

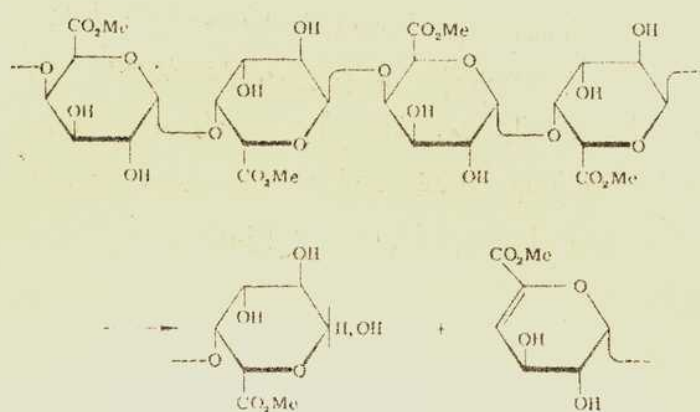


Figura 12. Despolimerización de las pectinas en medio neutro o alcalino.

dad de estos polímeros a la degradación, estaría determinada por la presencia de los grupos metil ésteres (Albersheim, 1959). Neukom y Deuel (1958) sugirieron que la ruptura de la unión glicosídica interna se produce por un mecanismo de β -desalcoxilación (Whistler y Be Miller, 1958). La β -desalcoxilación se inicia (Figura 13) por remoción del H activado del C-5, y se produce la ruptura del enlace gli-



Figura 13. Trans-eliminación en la unidad de ácido urónico de la pectina.

cosídico en la posición β al carbonilo, obteniéndose el anión glicosídico y la doble unión entre los C-4 y C-5. La degradación en medio neutro (buffer pH 6,8) es similar (Albersheim y col., 1960).

d) β -eliminación de las posibles uniones glicosídicas a serina o treonina: las estructuras del tipo indicado en la Figura 4, se caracterizan por la facilidad con la que dan lugar a una reacción de β -eliminación en condiciones alcalinas (Figura 5), con la consiguiente ruptura de la unión entre la proteína y el polisacárido.

e) Hidrólisis alcalina de los enlaces glicosídicos: si bien los glicósidos son generalmente considerados estables al álcali, se conocen ejemplos de glicósidos lábiles en medio alcalino (Ballou, 1954) y de hidrólisis de glicósidos en condiciones más enérgicas que las normales, bajo las cuales son estables (Dryselius y col., 1957, 1958). Se producen además nuevos extremos reductores en los cuales se puede iniciar la degradación alcalina.

f) Ruptura de las uniones químicas (formales) entre las hemicelulosas y los otros componentes de la pared celular. La unión aril glicosídica postulada entre las hemicelulosas y la lignina, es por lo general hidrolizada por el álcali (Ballou, 1954). El álcali también puede afectar la solubilización de los polisacáridos hemicelulósicos unidos no covalentemente con la celulosa (Blake y Richards, 1971 a).

g) Ruptura no específica de las uniones peptídicas (Monro y col., 1976) con degradación de la cadena proteica.

Conclusión

La ruptura parcial y no específica de las uniones químicas por el álcali acuoso usado para obtener las hemicelulosas, hace difícil el conocimiento de los polisacáridos componentes de las paredes celulares como polímeros discretos, pero interconectados, y de sus funciones estructurales dentro de la pared celular.

DESCRIPCION
DE LOS
RESULTADOS OBTENIDOS

ESTUDIO DE LAS SEMILLAS

La ruptura de las semillas permitió la observación de las tres partes componentes de las mismas: testa o cubierta seminal, endosperma o albumen, y embrión, las cuales fueron separadas manualmente para su estudio. Los porcentajes aproximados de estas partes y su contenido en nitrógeno están indicados en la Tabla 19.

Tabla 19. Porcentaje y contenido en nitrógeno y proteínas de las distintas partes de la semilla de Gleditsia triacanthos.

Fración	%	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	% del Nitrógeno total recuperado
Semilla entera ^a	...	3,4 ^b	21,4	...
Testa	27	1,1	7,0	8
Endosperma	34	1,9	11,6	16
Embrión	29	10,1	63,3	76
Remanente ^c	3	1,8	11,3	—

^a Humedad 9,74 % (100°, vacío, hasta peso constante)

^b Las determinaciones se llevaron a cabo sobre semilla entera desgrasada, se tomó el promedio de cuatro determinaciones y en base al contenido en grasas (1,97 % sobre semilla entera) se calculó el % Nitrógeno.

^c Liofilizado de las aguas utilizadas para producir la ruptura.

MORFOLOGIA INTERNA

Se realizó la observación microscópica de un corte transversal, hecho a mano alzada, de la semilla completa, y teñido con safranina al 50 %. Los resultados observados fueron los siguientes:

Testa o cubierta seminal (Figura 14 A):

La capa más externa o epidermis, también llamada capa en empalizada, característica de las semillas de leguminosas, está formada por los macroesclereidos, células columnares muertas de paredes celulares gruesas e irregulares (Figura 14 A, a). Las células de la capa subepidérmica son osteoesclereidos (Figura 14 A, b) y presentan entre ellas grandes espacios intercelulares. Ambos tipos de células (capas epidérmica y subepidérmica) se caracterizan por poseer gruesas paredes secundarias, fuertemente lignificadas. La naturaleza secundaria de estas paredes se corroboró con el microscopio con luz polarizada, dado que se observó una fuerte refringencia en estas dos capas. El tejido subyacente es un parénquima lacunoso (Figura 14 A, c) de células alargadas tangencialmente en la parte más externa y muy ramificadas y pequeñas en la parte interna.

DESCRIPCION
DE LOS
RESULTADOS OBTENIDOS

ESTUDIO DE LAS SEMILLAS

La ruptura de las semillas permitió la observación de las tres partes componentes de las mismas: testa o cubierta seminal, endosperma o albumen, y embrión, las cuales fueron separadas manualmente para su estudio. Los porcentajes aproximados de estas partes y su contenido en nitrógeno están indicados en la Tabla 19.

Tabla 19. Porcentaje y contenido en nitrógeno y proteínas de las distintas partes de la semilla de Gleditsia triacanthos.

Fración	%	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	% del Nitrógeno total recuperado
Semilla entera ^a	...	3,4 ^b	21,4	...
Testa	27	1,1	7,0	8
Endosperma	34	1,9	11,6	16
Embrión	29	10,1	63,3	76
Remanente ^c	3	1,8	11,3	—

^a Humedad 9,74 % (100°, vacío, hasta peso constante)

^b Las determinaciones se llevaron a cabo sobre semilla entera desgrasada, se tomó el promedio de cuatro determinaciones y en base al contenido en grasas (1,97 % sobre semilla entera) se calculó el % Nitrógeno.

^c Liofilizado de las aguas utilizadas para producir la ruptura.

MORFOLOGIA INTERNA

Se realizó la observación microscópica de un corte transversal, hecho a mano alzada, de la semilla completa, y teñido con safranina al 50 %. Los resultados observados fueron los siguientes:

Testa o cubierta seminal (Figura 14 A):

La capa más externa o epidermis, también llamada capa en empalizada, característica de las semillas de leguminosas, está formada por los macrosclereidos, células columnares muertas de paredes celulares gruesas e irregulares (Figura 14 A, a). Las células de la capa subepidérmica son osteosclereidos (Figura 14 A, b) y presentan entre ellas grandes espacios intercelulares. Ambos tipos de células (capas epidérmica y subepidérmica) se caracterizan por poseer gruesas paredes secundarias, fuertemente lignificadas. La naturaleza secundaria de estas paredes se corroboró con el microscopio con luz polarizada, dado que se observó una fuerte refringencia en estas dos capas. El tejido subyacente es un parénquima lacunoso (Figura 14 A, c) de células alargadas tangencialmente en la parte más externa y muy ramificadas y pequeñas en la parte interna.

Endosperma o albumen (Figura 14 A, d, C y D):

Presenta una estructura poco común. Es un tejido parenquimático de células muy ramificadas, con citoplasma densamente coloreado (Figura 14 C y D, r) y paredes gruesas y claras (no se tiñen con la safrana, Figura 14 C y D, s). Esto último indica que no están lignificadas. Además, cuando se observaron los cortes al microscopio con luz polarizada, las paredes del endosperma no mostraron la típica refringencia de las paredes secundarias, confirmandose así que son paredes primarias. Estas células limitan amplios espacios intercelulares como se observa en las Figuras 14 C y D, t.

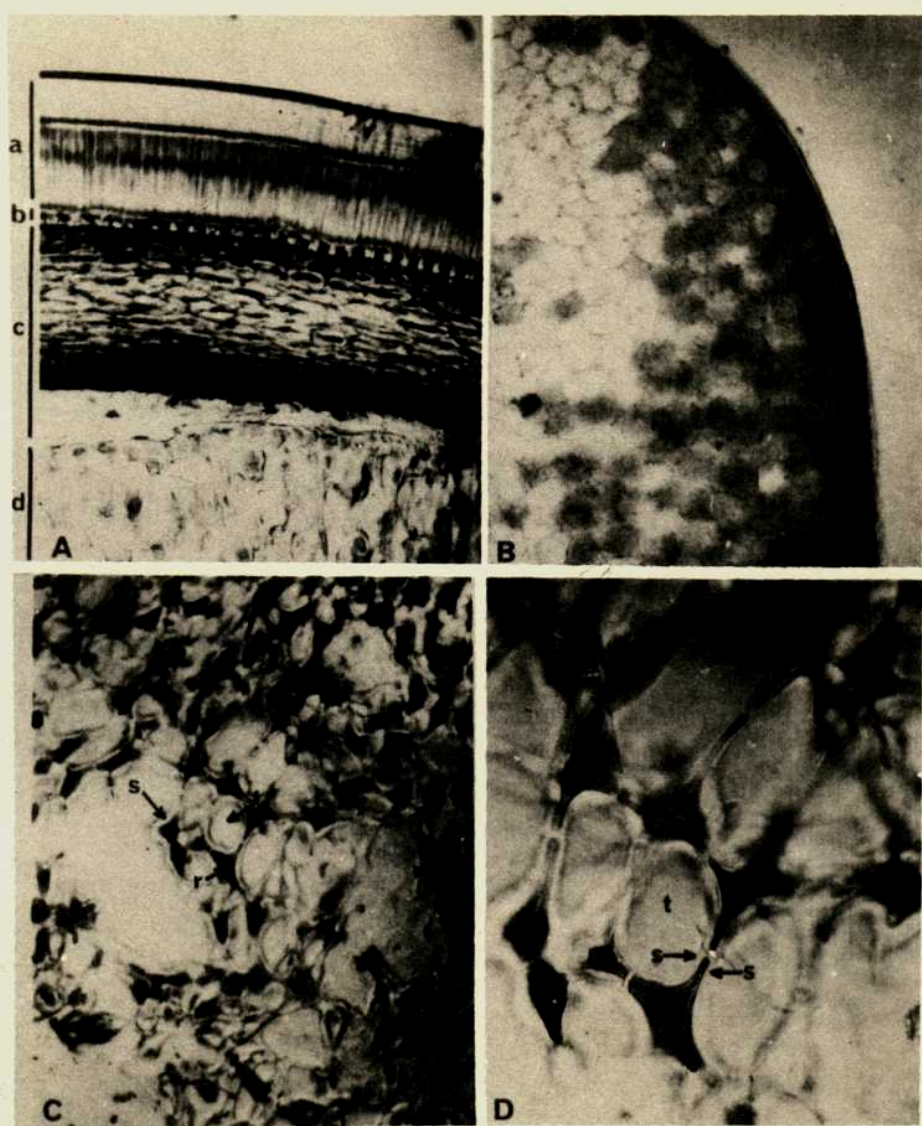


Figura 14. Gleditsia triacanthos. A, corte transversal de la testa y el endosperma; a, macroscleroidos (capa epidérmica); b, osteoscleroidos (capa subepidérmica); c, parénquima lacunoso y d, endosperma; B, corte transversal de un cotiledón; C y D, detalle del endosperma; r, citoplasma; s, pared primaria y t, espacio intercelular. (A, B y C: 200 x, D: 500 x)

El endosperma es un tejido de espesor considerable y en la parte más interna (cerca del embrión) hay varias capas aplastadas de células en desintegración.

Embrión:

Se estudió un corte transversal a nivel de los cotiledones (Figura 14 B), observándose un tejido parenquimático recubierto por una epidermis simple. Las paredes de las células que lo constituyen son delgadas y no se tiñen con la safranina. El contenido es amorfo y presenta color rosado con dicho colorante.

COMPOSICION EN AMINOACIDOS

La Tabla 20 muestra la composición en aminoácidos de las semillas de Gleditsia triacanthos. La determinación cuantitativa se llevó a cabo con el analizador automático sobre semilla entera desgrasada.

Tabla 20. Composición en aminoácidos de las semillas de Gleditsia triacanthos.

AMINOACIDO	g/16 g N	AMINOACIDO	g/16 g N
Acido aspártico	8,0	Isoleucina	4,6
Treonina	1,9	Leucina	7,9
Serina	4,7	Tirosina	4,5
Acido glutámico	20,0	Fenilalanina	5,0
Prolina	5,9	Lisina	6,2
Glicina	6,0	Histidina	3,0
Alanina	5,2	Arginina	12,2
Valina	4,9	Hidroxiprolina	0
Metionina	0,0		

GALACTOMANANOS

El aislamiento de los galactomananos se llevó a cabo por precipitación con etanol (hasta una concentración del 31,8 %) de los extractos acuosos obtenidos a partir de las semillas molidas, mediante una secuencia de extracciones sucesivas a temperatura ambiente (fracción $G_m^{(0)}$) y a 50 C (fracción G_{m50}). En ambos casos las extracciones se efectuaron en forma exhaustiva. Las propiedades generales de los galactomananos obtenidos figuran en la Tabla 21.

Tabla 21. Propiedades generales de los galactomananos aislados de las semillas de Gleditsia triacanthos.

Fracción	Rendimiento (%)	$[\alpha]_D^{25}$ ^a		Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Glucosamina (moles %)	Relación molar	
		A	B				Man:Gal	Man+Gal:Glut
G_m^d	19,5	+25,8	ND	1,7	9,2 ^b ; 4,0 ^c	2,4	1,8	38,1
G_{m50}	2,9	+21,8	+19,8	2,4	13,6 ^b ; 7,6 ^c	3,3	2,4	29,3
G_{mt}	15,7	+37,8	+31,3	1,9	10,9 ^b	2,7	2,0	36,0
G_{mt}^e	15-20	+23,0	ND	ND	1,8 ^c	ND	3,2-3,5	ND

^a Determinaciones efectuadas con concentraciones de 0,05 a 0,6 %; A: agua; B: ClNa 0,1 M. La presencia de proteínas hizo imposible todo intento de correlacionar los poderes rotatorios con la relación Man:Gal.

^b % Nitrógeno proteico x 6,25 (N proteico = N total - N aminoazúcares).

Sigue en la Pág. 54

(^o) La nomenclatura usada para las distintas fracciones está indicada en la Tabla 63, y un resumen de los procedimientos de extracción utilizados, en la Figura 20.

- ^c Determinado por el método de Lowry y col. (1951). Es interesante notar que el porcentaje de proteína obtenido a partir del nitrógeno proteico es aproximadamente el doble del dosado por este método usando albúmina de suero bovino como patrón, y coincidente si se usa una proteína vegetal (gliadina).
- ^d Cromatografías efectuadas en ausencia de patrón interno (Figura 15), indicaron la presencia de picos atribuibles a ácidos hexourónicos (4,6 moles %), que no pudieron ser identificados por no presentar los picos característicos de los ácidos hexourónicos estudiados. Se detectó asimismo la presencia de arabinosa (2,1 moles %).
- ^e Leschziner y Carezo (1970).

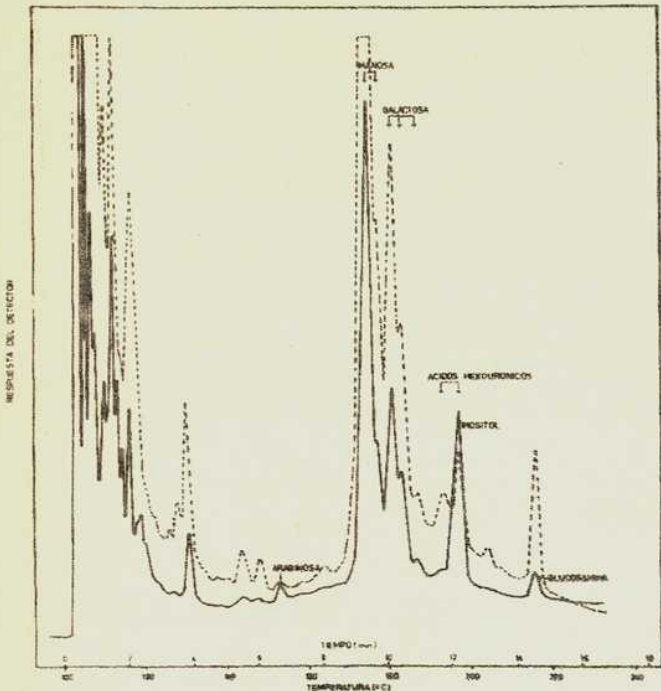


Figura 15. Cromatografía gas-líquido sobre OV-17 3 % de los metilglucósidos obtenidos de la fracción G_m por la técnica descrita en la parte experimental (—) y en ausencia de patrón interno (---).

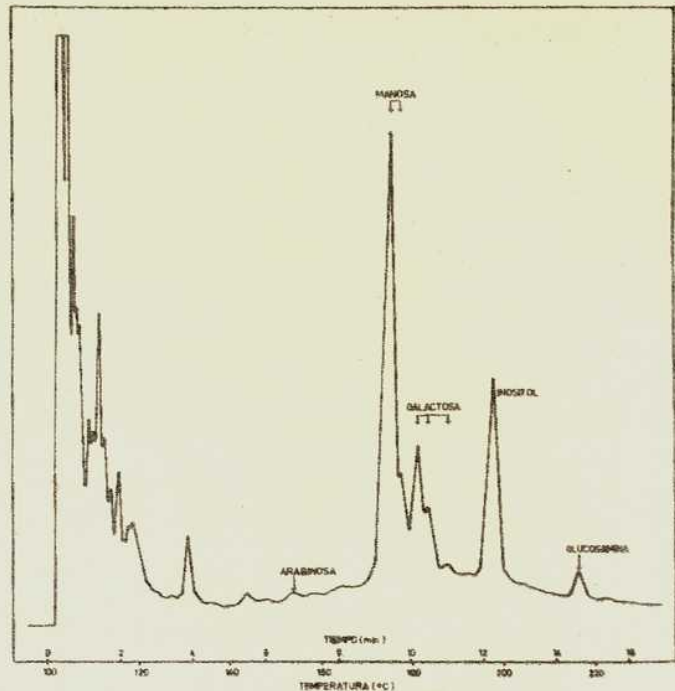


Figura 16. Cromatografía gas-líquido sobre OV-17 3 % de los metilglucósidos obtenidos de la fracción G_{m50}.

Tabla 22. Composición en aminoácidos de las fracciones obtenidas por extracción con agua a temperatura ambiente y a 50 C. (g/16 g N)^a.

Aminoácido	G _m	G _{m50}
Acido aspártico	10,2	12,1
Treonina	2,3	2,4
Serina	3,1	5,0
Acido glutámico	26,8	28,6
Prolina	5,8	5,1
Glicina	4,4	3,7
Alanina	4,5	5,4
Valina	5,0	5,4
Metionina	Tr	Tr
Isoleucina	4,1	3,7
Leucina	8,5	8,4
Tirosina	5,0	4,0
Fenilalanina	5,9	4,4
Lisina	7,4	3,2
Histidina	Tr	0,0
Arginina	5,4	8,8
Hidroxiprolina	0	0
Relación a/b ^b	2,7	3,4

^a En ésta y las subsiguientes Tablas se han indicado como trazas (Tr) los porcentajes del 0,5 a 1 % y como 0 los inferiores al 0,5 %.

^b Relación de los porcentajes de aminoácidos ácidos a aminoácidos básicos.

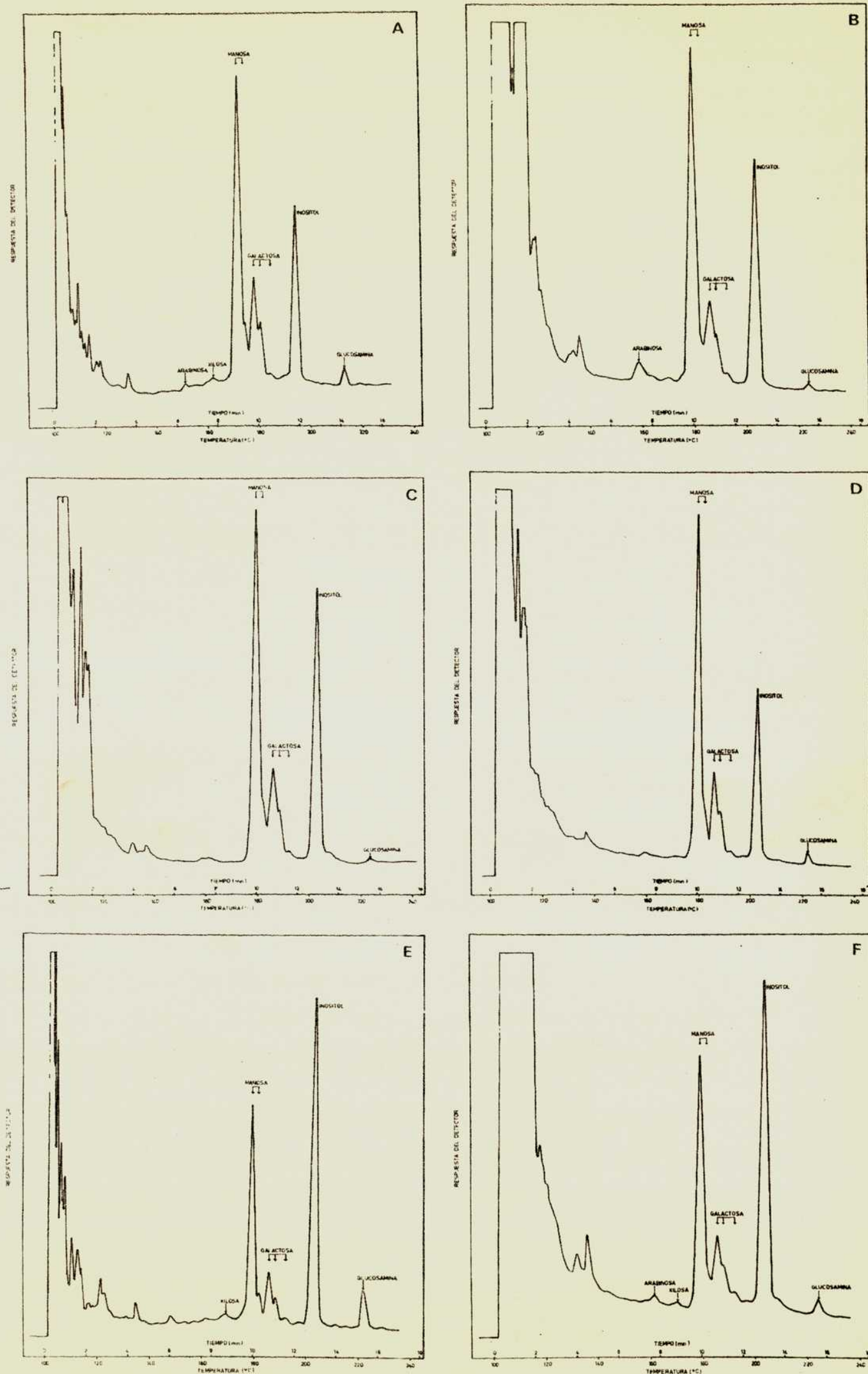


Figura 17. Cromatografía gas-líquido sobre OV-17 2 % de los metilglucósidos obtenidos de las fracciones: A, G₄₅; B, G₁₅; C, G₂₀; D, G₂₅; E, G₃₀; y F, G₃₅.

La composición en monosacáridos se determinó por cromatografía gaseosa (Figuras 15, 16 y 17 A) y por este método se detectó la presencia de un aminoazúcar, que fue tentativamente identificado como la 2-amino-2-desoxi-D-glucosa en base al "pattern" de resolución y el tiempo de retención de su N-acetil derivado, y a la co-cromatografía con una muestra auténtica del compuesto.

El material nitrogenado asociado a los galactomananos se atribuyó principalmente al contenido en proteínas de los mismos, debido a la detección de aminoácidos por cromatografía en papel (reactivo g), en los productos de hidrólisis ácida. La composición en aminoácidos de las proteínas está indicada en la Tabla 22.

El galactomanano obtenido con mayor rendimiento (G_m) se purificó por disolución en agua y reprecipitación con cantidades crecientes de etanol (Figura 18). El galactomanano precipitó en un amplio rango de concentración de etanol (desde un 15 % a un 30 %), correspondiendo

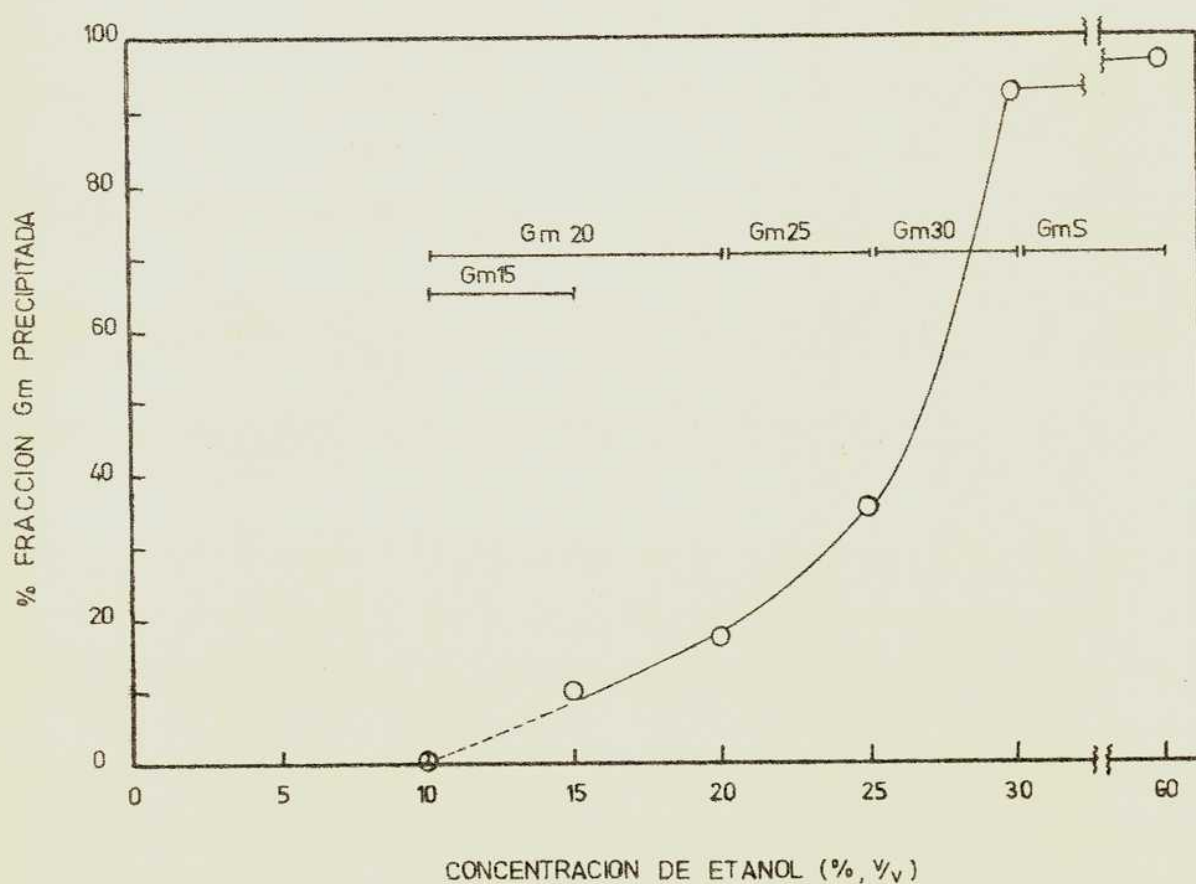


Figura 18. Precipitación fraccionada de la fracción G_m .

un 56,5 % del peso inicial al producto precipitado a una concentración de etanol del 25 al 30 %. A mayor concentración (límite superior 60 %) sólo se obtuvo un 4,2 % del galactomanano. Sobre las cinco fracciones obtenidas se efectuaron las determinaciones generales (Tabla 23).

Tabla 23. Propiedades generales de las subfracciones obtenidas por precipitación fraccionada de la fracción G_m .

Fracción	Concentración de etanol (% en vol.)	Rendimiento (%)	$(\alpha)_D^{20}$		Nitrógeno (%)	Proteínas ^b (%)	Glucosamina (moles%)	Relación molar	
			A	B				Man:Gal	Man+Gal:GluN
$G_{m15}^{c,d}$	10-15	10,0	+ 17,4	+ 16,9	7,4	46,1	0,9 ^f	2,4	100,0
G_{m20}	10-20	17,4	+ 22,8	+ 23,3	3,7	22,0	0,9 ^f	2,4	110,1
G_{m25}	20-25	18,2	+ 28,2	+ 34,5	3,4	20,6	2,2 ^f	2,6	44,5
G_{m30}^e	25-30	56,5	+ 33,8	+ 36,9	0,4	0	11,3	2,8	7,1
G_{ms}	soluble en etanol 60%	4,2	+ 17,4	+ 17,5	2,0	11,4	3,3	1,9	29,3

^{a,b} Ver Tabla 21.

^c Obtenida en un fraccionamiento previo.

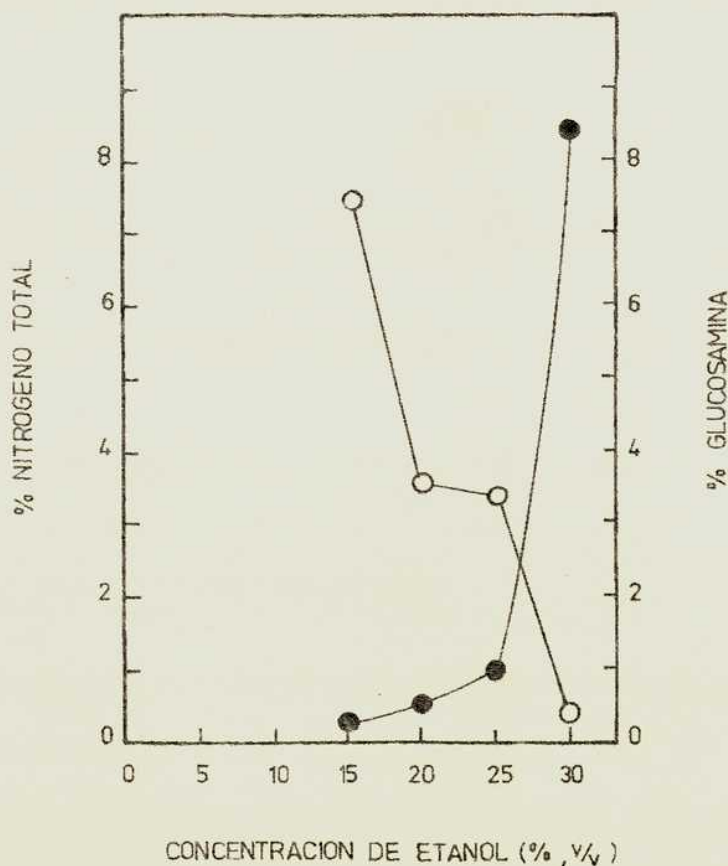
^d Se determinó la presencia de arabinosa: 9,2 moles %.

^e Se determinó la presencia de ácidos hexurónicos (ver nota d, Tabla 21): 8,3 moles %.

^f Se calculó efectuando las cromatografías a distintas sensibilidades.

Cuando se intentó redissolver en agua la fracción de mayor contenido en proteínas (G_{m15}), se obtuvo un insoluble (G_{m15i} : nitrógeno 10,0 %) y la fracción solubilizada (G_{m15s}) presentó un contenido en nitrógeno total (2,4 %) del orden encontrado para las restantes fracciones.

La Figura 19 muestra la variación del contenido en nitrógeno

Figura 19. Variación del contenido en nitrógeno total (o) y en glucosamina (e) de las subfracciones de G_m .

total y en aminoazúcares encontrada para las subfracciones de G_m .

Como los galactomananos obtenidos presentaban propiedades lige

ramente distintas a la del estudiado por Leschziner y Cerezo (1970)(Tabla 21), se llevó a cabo en nuestro caso la extracción del galactomana no en las condiciones utilizadas por dichos autores (extracción directa a 50 C). Los resultados están indicados en la Tabla 21 bajo la denominación de fracción G_{m1}.

Por otra parte, como se detectó la presencia de mananos y/o galactomananos de menor contenido en galactosa en las fracciones obtenidas luego de agotar el material por extracción acuosa a temperatura ambiente y a 50 C, se procedió a la extracción directa del endosperma separado de las semillas y previamente molido. Se efectuó primeramente la extracción acuosa exhaustiva de los galactomananos solubles a temperatura ambiente y a 50 C (Tabla 24), y el residuo remanente se trató

Tabla 24. Aislamiento de los galactomananos del endosperma de semillas de *Gleditsia triacanthos*.

Concentración de etanol (%, en vol.)	Rendimiento ^a (%)
Extracción acuosa a temperatura ambiente	
10-40	0
40-50 ^b	10,9 (3,0)
50-60	17,6
60-70	9,5
Soluble etanol 70 %	14,0
Total	52,0
Extracción acuosa a 50 C	
10-25	0
25-32 ^b	15,9
32-70	1,6
10-35	0
35-55	1,3
Soluble etanol 70 %	ND
Total	18,8
Extracción alcalina a temperatura ambiente ^c	
10-25	0
25-32 ^d	3,6 (4,3)
32-48 ^d	2,3 (3,4)
Soluble etanol 75 %	ND
Total	5,9
Extracción acuosa a 100 C ^c	
10-25	0
25-30 ^b	1,1
30-40 ^b	2,7 (3,9)
40-50	1,6
50-60	0,5
60-70	0,5
Soluble etanol 70 %	ND
Total	6,4

^a Se expresaron los porcentajes de recuperación relativos (incluido el residuo insoluble) . Los valores entre paréntesis indican la relación Man:Gal.

^b La determinación de nitrógeno total dio dentro del error experimental del método (\pm 0,3 %).

^c Extracciones no exhaustivas.

^d Contenido en proteínas totales de 5,0 % y 5,6 % respectivamente.

por separado con agua a ebullición (Tabla 24) y con solución de hidróxido de potasio 10 % a temperatura ambiente (Tabla 24). En estos dos casos no se efectuaron las extracciones en forma exhaustiva. Al cabo de las mismas quedó un residuo insoluble apreciable.

Se llevaron a cabo varias cromatografías analíticas sobre Sephadex modificado para intercambio iónico (DEAE-Sephadex A-50 y SP-Sephadex C-50) con las fracciones G_m (proteínas 4,0 %) y G_{m20} , esta última de mayor contenido en proteínas (22,0 %). Se utilizaron cantidades de 12 a 25 mg disueltos en volúmenes de solución buffer de 6 a 20 ml, con el objeto de minimizar los efectos producidos por la viscosidad de las soluciones de los galactomananos. La elución se realizó bajo distintas condiciones partiendo de soluciones buffer de baja fuerza iónica (0,02 o en presencia de cloruro de sodio ($M = 0,1 M$), e incrementando gradualmente la fuerza iónica hasta 0,5 (e incluso hasta valores extremadamente altos como 1,5). En todas las cromatografías realizadas se obtuvieron diagramas de elución que muestran un único pico, formado por los máximos coincidentes en las determinaciones de hidratos de carbono y proteínas (reactivo de fenol-ácido sulfúrico y de fenol según Folin-Ciocalteu, respectivamente), que corresponde a los valores de elución de productos neutros (no retenidos por el gel intercambiador de iones)

H E M I C E L U L O S A S

Aislamiento y fraccionamiento en hemicelulosas A, B y C.

El residuo de las semillas proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos con agua a temperatura ambiente y con agua a 50 C, se extrajo con solución de hidróxido de potasio 10 %, bajo corriente de nitrógeno y a temperatura ambiente; el procedimiento se repitió dos veces. Cada uno de los extractos alcalinos se dializó hasta neutralidad, precipitando así la hemicelulosa A. La hemicelulosa B se obtuvo concentrando las aguas madres y volcándolas sobre etanol, y por concentración y liofilización de la solución remanente se aisló la hemicelulosa C. Durante la neutralización se detectó la presencia de hidratos de carbono en las aguas de diálisis.

Los porcentajes de hemicelulosa total extraída variaron entre el 6 y 14 % (Tabla 25). La hemicelulosa A se aisló con un rendimiento del 0,8 al 2,2 %, y cuando la precipitación de la hemicelulosa A se llevó a cabo por el método de Blake y col. (1971), que concentra la suspensión de las hemicelulosas a una quinta parte de su volumen, calienta a baño maría durante 10 minutos y deja a 30 C durante 5 horas, el porcentaje aumentó hasta un 6,7 % (Tabla 25. Procedimientos 1 y 2, respectivamente).

por separado con agua a ebullición (Tabla 24) y con solución de hidróxido de potasio 10 % a temperatura ambiente (Tabla 24). En estos dos casos no se efectuaron las extracciones en forma exhaustiva. Al cabo de las mismas quedó un residuo insoluble apreciable.

Se llevaron a cabo varias cromatografías analíticas sobre Sephadex modificado para intercambio iónico (DEAE-Sephadex A-50 y SP-Sephadex C-50) con las fracciones G_m (proteínas 4,0 %) y G_{m20} , esta última de mayor contenido en proteínas (22,0 %). Se utilizaron cantidades de 12 a 25 mg disueltos en volúmenes de solución buffer de 6 a 20 ml, con el objeto de minimizar los efectos producidos por la viscosidad de las soluciones de los galactomananos. La elución se realizó bajo distintas condiciones partiendo de soluciones buffer de baja fuerza iónica (0,02) o en presencia de cloruro de sodio ($M = 0,1$ M), e incrementando gradualmente la fuerza iónica hasta 0,5 (e incluso hasta valores extremadamente altos como 1,5). En todas las cromatografías realizadas se obtuvieron diagramas de elución que muestran un único pico, formado por los máximos coincidentes en las determinaciones de hidratos de carbono y proteínas (reactivo de fenol-ácido sulfúrico y de fenol según Folin-Ciocalteu, respectivamente), que corresponde a los valores de elución de productos neutros (no retenidos por el gel intercambiador de iones).

H E M I C E L U L O S A S

Aislamiento y fraccionamiento en hemicelulosas A, B y C.

El residuo de las semillas proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos con agua a temperatura ambiente y con agua a 50 C, se extrajo con solución de hidróxido de potasio 10 %, bajo corriente de nitrógeno y a temperatura ambiente; el procedimiento se repitió dos veces. Cada uno de los extractos alcalinos se dializó hasta neutralidad, precipitando así la hemicelulosa A. La hemicelulosa B se obtuvo concentrando las aguas madres y volcándolas sobre etanol, y por concentración y liofilización de la solución remanente se aisló la hemicelulosa C. Durante la neutralización se detectó la presencia de hidratos de carbono en las aguas de diálisis.

Los porcentajes de hemicelulosa total extraída variaron entre el 6 y 14 % (Tabla 25). La hemicelulosa A se aisló con un rendimiento del 0,8 al 2,2 %, y cuando la precipitación de la hemicelulosa A se llevó a cabo por el método de Blake y col. (1971), que concentra la suspensión de las hemicelulosas a una quinta parte de su volumen, calienta a baño maría durante 10 minutos y deja a 30 C durante 5 horas, el porcentaje aumentó hasta un 6,7 % (Tabla 25. Procedimientos 1 y 2, respectivamente).

Tabla 25. Comparación de los porcentajes obtenidos para las hemicelulosas A, B y C en ocho series de extracciones distintas.^a

HEMICELULOSA	EXTRACCIONES										
	1	2	3	4	5	6		7		8	
	Procedimiento 1			Proc. 2		Procedimiento mixto ^b					
						1	2 ^c	1	2 ^c	1	2 ^c
1A	0,4	1,1	1,4	4,7	0,9	0,3	2,5	0,01	0,9	0,2	2,3
2A	0,08	- ^d	0,6	1,4	0,6	0,2	2,1	0,03	0,8	0,06	0,5
3A	0,3	0,2 ^e	0,2	0,6	0,1	0,02	0,1	0,02	0,3	0,04	0,3
Total A	0,8	1,3 ^f	2,2	6,7	1,6	0,5	4,7	0,06	2,0	0,3	3,1
1B	2,9	3,4	2,0	1,9	4,4		2,7		1,7		5,1
2B	0,4	- ^d	0,7	0,7	2,8		1,5		2,0		1,5
3B	0,5	0,5 ^e	0,6	1,0	1,6		0,1		0,4		0,9
Total B	3,8	3,9 ^f	3,3	3,6	8,8		4,3		4,1		7,5
1C	1,0	2,9	2,8	1,1	1,4		1,3		0,7		2,1
2C	0,2	- ^d	1,0	0,3	1,1		0,5		0,6		- ^d
3C	0,06	0,6 ^e	0,6	0,6	0,8		0,4		0,3		1,2
Total C	1,26	3,5 ^f	4,4	2,0	3,3		2,2		1,6		3,3 ^f
Total	5,9	8,7 ^f	9,9 ^g	12,3 ^g	13,7		11,2 ^g		7,7		13,9 ^f

^a Porcentajes respecto de la semilla entera. Las extracciones 4, 5 y 8 se efectuaron sobre semillas de otra procedencia.

^b Resultados obtenidos de aplicar el Procedimiento 1 para precipitar HA y al sobrenadante el Procedimiento 2 para precipitar el resto de HA, y aislar HB y HC.

^c Suma de los porcentajes obtenidos por los Procedimientos 1 y 2.

^d Pérdida total de la fracción durante alguna etapa del procedimiento.

^e Pérdida parcial de la fracción durante alguna etapa del procedimiento.

^f Porcentajes mínimos debido a d y/o e.

^g Se pesaron los residuos (fracción S_H) y se obtuvieron 16,9 %, 10,7 % y 15,6 % para las extracciones 3, 4 y 6, respectivamente.

Tabla 26. Distribución del contenido en nitrógeno de las hemicelulosas A, B y C en ocho series de extracciones distintas.^a

HEMI CELULOSA	EXTRACCIONES										
	1	2	3	4	5	6	7		8		
	Procedimiento 1			Proced. 2		Procedimiento mixto					
						1	2	1	2	1	2
1A				12,8			9,2	6,0	11,4	7,0	11,5
2A		-b		7,9		5,3				7,5	10,2
3A				6,6						5,6	10,7
1B	7,3		12,6	14,8							8,8
2B	3,3		10,0	4,2							8,4
3B	2,3		6,1	5,5							8,4
1C	11,1	7,7	9,3	9,9	10,7						11,9
2C	3,4		7,2	9,2	10,2						
3C	1,9	5,3	4,7	5,4	8,8						8,0

^a Se indicaron los porcentajes de nitrógeno total. (Ver explicaciones en la Tabla 25).

^b El total de las hemicelulosas A de las extracciones 1, 2 y 3 reunidas presentó un contenido en nitrógeno del 5,0 %.

La hemicelulosa B se obtuvo con un rendimiento del 3,3 al 4,3% y la hemicelulosa C con un rendimiento del 1,3 al 4,4 %.

El residuo remanente al cabo de tres extracciones sucesivas (fracción S_H), se extrajo una vez más en las condiciones indicadas y se obtuvieron las hemicelulosas A, B y C con un rendimiento del 0,04, 1,3 y 0,08 %, respectivamente. Estos resultados fueron considerados co

mo prueba de la extracción exhaustiva de las hemicelulosas en las condiciones experimentales usadas.

La Tabla 25 muestra los porcentajes obtenidos en ocho series de extracciones distintas y la Tabla 26, el contenido en nitrógeno de las respectivas fracciones.

La composición cualitativa y cuantitativa en monosacáridos de las hemicelulosas A, B y C está indicada en la Tabla 27, junto con algunas determinaciones generales. La composición en aminoácidos del material proteico asociado a los mismos, figura en la Tabla 28.

Tabla 27. Composición en monosacáridos de las fracciones aisladas de las semillas de *Gleditsia triacanthos*.^a

Componente	U	P	HA	HB ^b	HC ^c	Sh	Shp ^{c,d}
Arabinosa	31,6	42,5	34,2	46,1	28,3	33,1	7,4
Fucosa	2,0	3,0	2,9	7,5	5,9	1,7	0
Xilosa	25,8	4,6	7,9	15,4	15,3	3,4	10,8
Manosa	22,9	10,8	16,3	11,4	19,0	6,2	6,7
Galactosa	10,5	3,6	6,4	5,2	10,0	4,0	15,9
Glucosa	0	1,6	3,0	1,4	1,3	8,6	8,1
Acido galacturónico	4,4	30,5	22,8 ^e	9,2 ^e	4,5	26,4	19,9
Glucosamina	1,7	3,2	6,5	3,4	13,0	16,8	20,5
Proteínas	23,9	25,3	29,0 ^f	46,9	59,5 ^g 53,1 ^g	5,3	0
Metoxilo	2,8	3,9	0 ^h	0 ^h	0 ^h	0 ^h	0 ^h

^a Los resultados se expresaron de la siguiente manera: monosacáridos, moles %; proteínas g/100 g; metoxilo g/100 g de hidratos de carbono.

^b Composición promedio calculada a partir de las fracciones componentes (ver Tabla 42).

^c Se determinó la presencia de ácido glucurónico: HC, 2,7 % y Shp, 10,7 %, aunque en las condiciones utilizadas no puede excluirse la presencia de ácido 4-O-metil glucurónico.

^d Al cabo de las etapas de hidrólisis y metanólisis se observó un residuo insoluble apreciable de posible naturaleza celulósica.

^e El ácido hexourónico se determinó por descarboxilación (Barker y col., 1958) y por el método del carbazol (Galambos, 1967).

^f % Nitrógeno proteico x 6,25 (N proteico - N total - N aminoazúcares).

^g G/100 g de muestra, determinado por el método de Lowry y col. (1951) y expresado como albúmina.

^h Dentro de los límites del método usado (1 % G/100 g, ver Parte Experimental) no se detectó metoxilo.

Tabla 28. Composición en aminoácidos de las fracciones aisladas de las semillas de *Gleditsia triacanthos* (g/16g N).

Aminoácido	U	P	HA	HB ^a	HC	Sh
Acido aspártico	8,8	6,8	8,8	8,6	13,3	12,8
Treonina	1,9	1,4	2,0	1,2	1,9	2,6
Serina	4,2	4,1	4,7	2,5	4,6	4,4
Acido glutámico	26,9	40,1	19,9	42,7	21,0	13,6
Prolina	5,0	7,3	7,2	± 2,4 ^b	5,2	7,0
Glicina	4,1	7,3	4,5	3,3	2,5	6,3
Alanina	5,1	3,4	5,9	3,3	5,6	6,2
Valina	4,1	2,6	5,7	3,1	5,5	8,5
Metionina	0,0	0,0	1,2	1,5	2,7	Tr

////

Aminoácido	U	P	HA	HB ^a	HC	S _h
Isoleucina	3,5	2,2	5,5	3,0	4,1	8,6
Leucina	7,1	4,7	9,1	5,1	9,6	12,1
Tirosina	3,6	1,6	4,7	1,5	5,2	1,9
Fenilalanina	3,4	1,9	5,9	2,7	5,4	5,2
Lisina	6,2	4,2	4,5	4,7	4,8	2,7
Histidina	0,0	0,0	1,4	0	1,7	Tr
Arginina	16,3	12,5	8,9	12,6	7,0	ND ^c
Hidroxiprolina	0	0	0	1,7	0 ^d	8,3
Hidroxilisina					< 0,2 ^e	
Tirosina					3,8 ^f	
Triptofano					2,4 ^f	
Relación a/b	1,6	2,8	1,9	≤ 3,0	2,5	≤ 9,8

^a Composición promedio calculada a partir de las fracciones componentes (ver Tabla 43).
^b Oscurecido por el pico del ácido glutámico.
^c Oscurecido por el pico del amoníaco.
^d Dentro de los límites del método usado (Leach, 1960) no se detectó hidroxiprolina. (< 0,4 g/100g).
^e Dentro de los límites del método usado (Blumenkrantz y Prockof, 1971) no se detectó hidroxilisina (< 0,2 g/100g).
^f G/100g de muestra, determinado por el método de Benzcs y Schmid (1957).

S U S T A N C I A S P E C T I C A S

Aislamiento y fraccionamiento

El residuo de las semillas proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos con agua a temperatura ambiente y con agua a 50 C, se extrajo con solución de oxalato de amonio 1 % a reflujo. El procedimiento se repitió hasta extracción exhaustiva. Las sustancias pécticas (fracción P) se aislaron del extracto acuoso acidificado a pH 4 (no se observó precipitación) y volcando sobre acetona. La purificación se llevó a cabo suspendiendo el producto en agua y dializando. Se detectaron hidratos de carbono en las aguas de diálisis.

Por analogía con el fraccionamiento efectuado sobre las hemice-lulosas, las sustancias pécticas se fraccionaron de la siguiente mane-ra: se suspendieron en agua y se separó el material insoluble (frac-ción PA); el sobrenadante se concentró, se llevó a pH 4 sin que se ob-servara precipitación, y se volcó sobre acetona para precipitar la fracción PB; por concentración y liofilización de la solución remanen-te se obtuvo la fracción PC.

Los datos obtenidos están indicados en la Tabla 29.

La composición cuali y cuantitativa en monosacáridos de la fracción P figura en la Tabla 27, y la de los aminoácidos en la Tabla 28.

Tabla 29. Aislamiento y fraccionamiento de las sustancias pécticas.

Fracción	Rendimiento (%)	Nitrógeno (%)	Metoxilo ^a (%)
P	20,1	4,1	3,9
PA	3,0	2,4	0 ^b
PB	15,3	3,3	3,3
PC	1,7	17,0	ND
S _p	20,0	6,6	2,0

^a Calculado sobre la parte de hidratos de carbono.

^b Ver nota h, Tabla 27.

EXTRACCIONES CRUZADAS

El residuo proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos y las hemicelulosas, se extrajo de la manera descripta para el aislamiento de las sustancias pécticas (Secuencia N° 1, Tabla 30), y del residuo remanente de la extracción exhaustiva de los galactomananos y las sustancias pécticas, se extrajeron las hemicelulosas por el Procedimiento 2 (Secuencia N° 2, Tabla 30). Los residuos de ambas secuencias (fracciones S_{hp} y S_{ph}, respectivamente) se recuperaron por diálisis y liofilización. La composición cuali y cuantitativa en monosacáridos de la fracción S_{hp} figura en la Tabla 27. La Tabla 28 muestra, a efectos comparativos, la composición en aminoácidos de la fracción S_h.

Tabla 30. Extracciones cruzadas.

Secuencia N° 1		Secuencia N° 2	
Fracción	%	Fracción	%
G _m	19,5	G _m	19,5
G _{m50}	2,9	G _{m50}	2,9
H	6-14 ^c	P	20,1
P	1,2	H	4,9 ^a (7,8) ^b
S _{hp}	12,9	S _{ph}	13,7
Total	42,5-50,5 ^c	Total	61,1

^a Valor obtenido con una única extracción alcalina; a partir de la Tabla 25 puede deducirse que esta extracción representa el 63 % de la H total.

^b Valor correspondiente al total de H.

^c Valor variable (ver Tabla 25).

POLISACARIDOS SOLUBLES EN SOLUCION DE UREA 7 M

Se extrajeron del residuo proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos con agua a temperatura ambiente y a 50 C, por tratamiento con solución de urea 7 M. El procedimiento se repitió

dos veces, y los polisacáridos se aislaron del extracto acuoso total, luego de dializar y concentrar, por precipitación con etanol (fracción U: rendimiento 1 %, nitrógeno 3,8 %, metoxilo 2,1 %). La composición cuali y cuantitativa en monosacáridos está indicada en la Tabla 27 y la de aminoácidos en la Tabla 28.

Un resumen de los procedimientos de extracción utilizados aparece en la Figura 20.

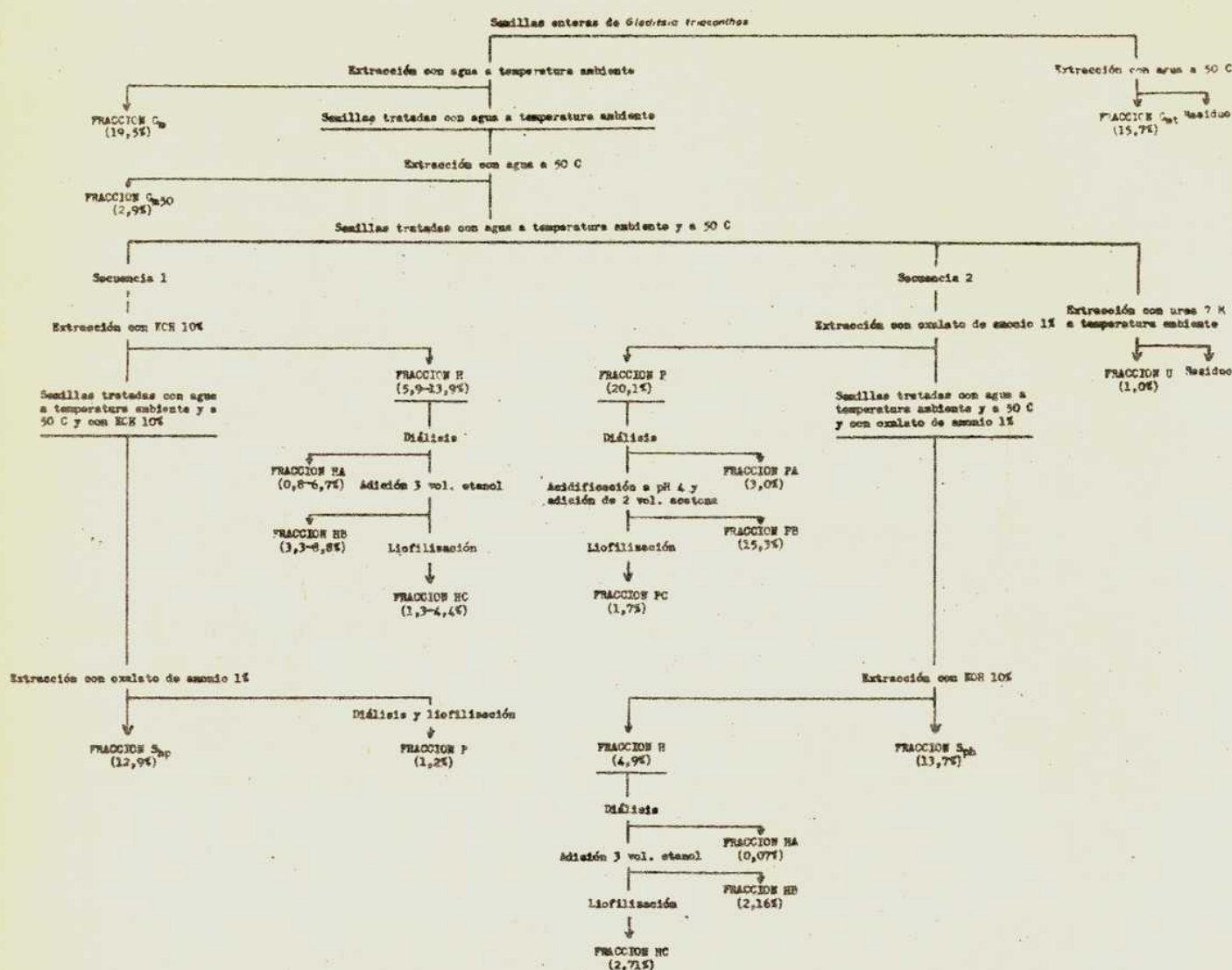


Figura 20. Extracción y fraccionamiento de los polisacáridos de las semillas de *Gleditsia triacanthos*. Los números entre paréntesis indican los porcentajes respecto de la semilla entera.

HEMICELULOSA A

PROPIEDADES GENERALES

La hidrólisis ácida total de la fracción HA se llevó a cabo por el método 1. Por cromatografía sobre papel y placa delgada en varios solventes de desarrollo, se observó arabinosa como principal componente, xilosa, una mezcla de hexosas y ácidos urónicos. No se detectó la presencia de ramnosa. La mezcla de hexosas fue tentativamente identificada como manosa ($R_{Glu} 0,69$, electroforesis sobre papel en buffer de borato pH 9,2; $R_{Xil} 0,94$, solvente 4), glucosa ($R_{Xil} 0,80$, sol

vente 3; R_{x11} 0,86, solvente 4) y galactosa (R_{x11} 0,71, solvente 3; R_{x11} 0,81, solvente 4). El ácido urónico fue tentativamente identificado como ácido galacturónico por cromatografía en papel (R_{x11} 0,09, solvente 3) y por el método de Dische y Rothschild (1967); estos resultados no excluyen la presencia de pequeñas cantidades de ácido glucurónico. En las condiciones de hidrólisis usadas no se detectaron aminoazúcares (solvente 3, reactivo f) ni cetosas (solventes 3 y 5, reactivo d).

La hidrólisis ácida total de la fracción HA por el método 2 dio resultados análogos. Se compararon asimismo los productos de hidrólisis ácida total (método 1) de las fracciones HA obtenidas en distintas extracciones y se observaron en todos los casos resultados equivalentes.

La determinación cuantitativa de los monosacáridos componentes se llevó a cabo por cromatografía gaseosa (Tabla 27). Por este método no se detectó la presencia de ácido N-acetilneuramínico, y cuando se determinó por el método de Warren (1959), dio dentro del error experimental ($< 1,0 \%$). La Tabla 27 muestra también algunas propiedades generales. La composición en aminoácidos está indicada en la Tabla 28.

La homogeneidad de la fracción HA se analizó por electroforesis sobre papel de fibra de vidrio, y se obtuvo (Figura 21) una única mancha dispersa.

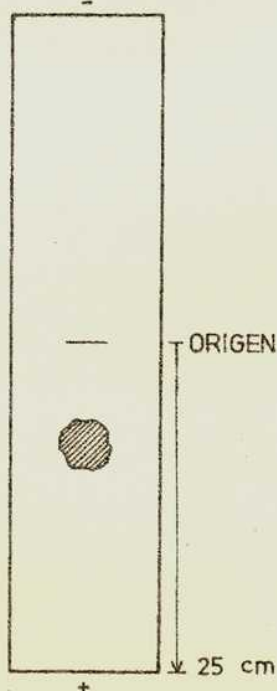


Figura 21. Dibujo de la corrida obtenida por electroforesis sobre papel de fibra de vidrio de la fracción HA. Se llevó a cabo en KOH 30 %, a 100 volts durante 80 minutos.

Por ultracentrifugación se obtuvo un único pico (Figura 22). Su coeficiente de sedimentación ($S_{20,\omega}$) fue de 1.03×10^{-13} . Sin embargo, el bajo tiempo de análisis empleado (máximo de 31 minutos) debido a la fuerte alcalinidad del medio utilizado para solubilizar la HA, determinó un mayor porcentaje de error en el cálculo de $S_{20,\omega}$, y la no observación de la deformación del pico en función del tiempo atribuible a los posibles productos de menor peso molecular.

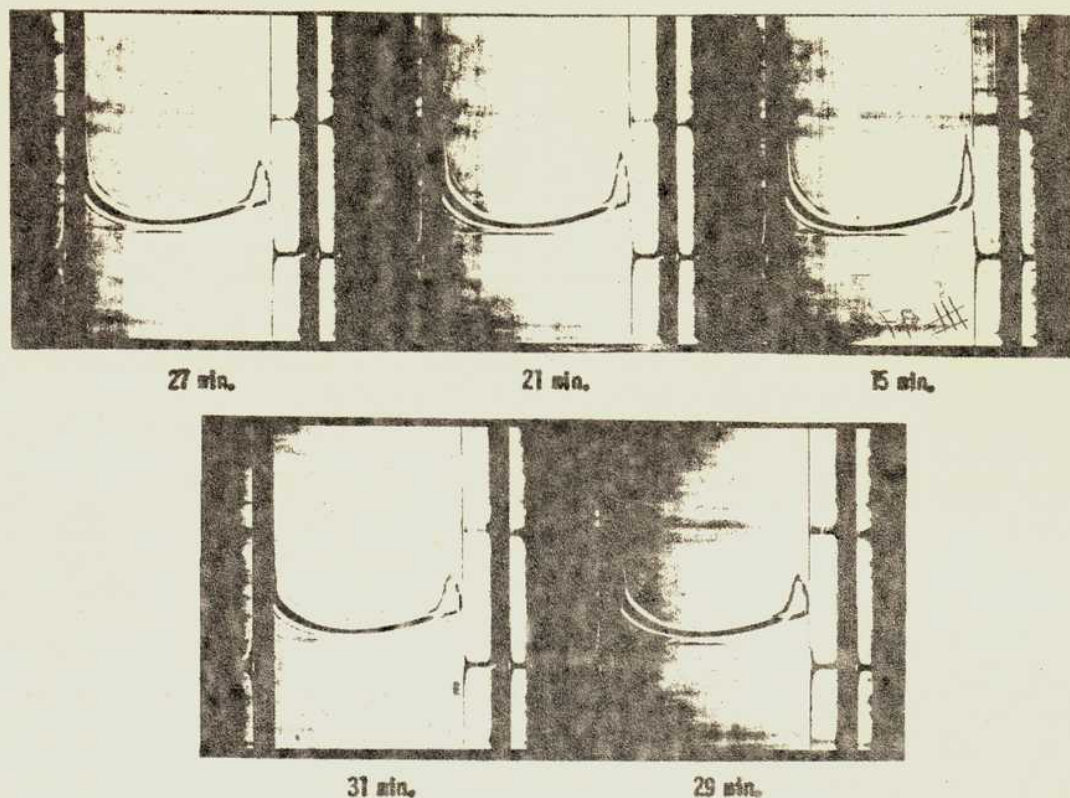


Figura 22. Ultracentrifugación de la fracción HA. Las placas se obtuvieron con una solución 0,3 % en hidróxido de potasio 30 % a 42.040 rpm, y las fotos fueron tomadas a los 15, 21, 27, 29 y 31 minutos después de llegar a la velocidad indicada.

Los estudios de homogeneidad se completaron con los métodos de fraccionamiento que se detallan a continuación.

FRACCIONAMIENTO DE HA. PROPIEDADES DE LAS FRACCIONES.

Cuando se intentó redissolver la hemicelulosa A en hidróxido de potasio 10 % con el objeto de proceder a su purificación por precipitación, una parte no se disolvió (fracción HA_1). Los porcentajes de hemicelulosa insoluble resultaron dependientes del procedimiento de solubilización utilizado, ya que en el caso de los subfraccionamientos 1 y 2 (Tabla 31) en los que se efectuó la agitación manualmente, se observaron los menores porcentajes de solubilización (fracción HA_{10}); en cambio, si se utiliza la agitación mecánica constante durante un lapso de tiempo menor, el porcentaje de insoluble remanente (subfraccionamientos 3 y 4, Tabla 32) resultó considerablemente disminuido.

La fracción HA_{10} se dializó hasta neutralidad y en el caso de los subfraccionamientos 1 y 2 no se observó precipitación, recuperando

se por liofilización. En los subfraccionamientos 3 y 4 se obtuvieron las hemicelulosas A, B y C por el procedimiento general (Procedimiento 2), luego de la precipitación durante la diálisis.

Los porcentajes de recuperación y las propiedades generales están indicados en las Tablas 31 y 32. Las electroforesis sobre papel de fibra de vidrio de las fracciones HA_i (soluble en KOH 30 %) y HA₁₀ mos

Tabla 31. Solubilidad de la fracción HA en hidróxido de potasio 10 %.

Fracción	Subfraccionamiento 1 ^a			Subfraccionamiento 2		
	Recuperación (%)	Nitrógeno (%)	$(\alpha)_D^{20}$	Recuperación (%)	Nitrógeno (%)	$(\alpha)_D^{20}$
HA _i	72,0	1,0	- ^b	80,6	- ^c	- ^c
HA ₁₀	25,3	3,7	-15,0 ^d	18,6 ^f	4,3	-27,7 ^e
Total	97,3			98,9		

^a Ambas fracciones (HA_i y HA₁₀) mostraron por cromatografía en papel los mismos azúcares componentes que la fracción HA. Se determinó el contenido en hexosas y ácidos urónicos por el método del carbazol (Galanos, 1967) y se expresaron (g/100g) como glucosa y ácido galacturónico: HA_i, 9,6 % y 8,9 %, respectivamente, y HA₁₀, 14,2 % y 3,5 %, respectivamente.

^b Insoluble.

^c La fracción fue sometida a un posterior fraccionamiento (ver Tabla 33).

^d C 0,2, KOH 10 %.

^e C 0,2, KOH 30 %.

^f Ver nota h, Tabla 27.

Tabla 32. Solubilidad de la fracción HA en hidróxido de potasio 10 % y fraccionamiento en HA, HB y HC.

Fracción	Subfraccionamiento 3		Subfraccionamiento 4	
	Recuperación (%)	Nitrógeno (%)	Recuperación (%)	Nitrógeno (%)
HA _i	8,0	1,2	1,7	1,5
HA	42,6	9,9	47,8	12,8
HB	21,5	5,7	9,6	9,7
HC	8,5	9,1	13,2	9,8
Total	80,6		72,3	

traron una única mancha próxima al origen, neta en el primer caso (la fracción no resultó totalmente soluble) y extendida y difusa en el segundo (Figura 23).

Los resultados anteriores sugirieron el procedimiento a seguir para el fraccionamiento de la hemicelulosa A: se extrajo con solución de hidróxido de potasio 10 % para obtener la fracción HA₁₀ (Tabla 33). El residuo insoluble se extrajo nuevamente con solución de hidróxido de potasio 15 %, obteniéndose una nueva fracción (HA₁₅). El tratamiento se continuó con soluciones de hidróxido de potasio de concentraciones crecientes (20 %, 25 % y 30 %), obteniéndose las fracciones HA₂₀, HA₂₅ y HA₃₀, solubles a dichas concentraciones de álcali, y al cabo

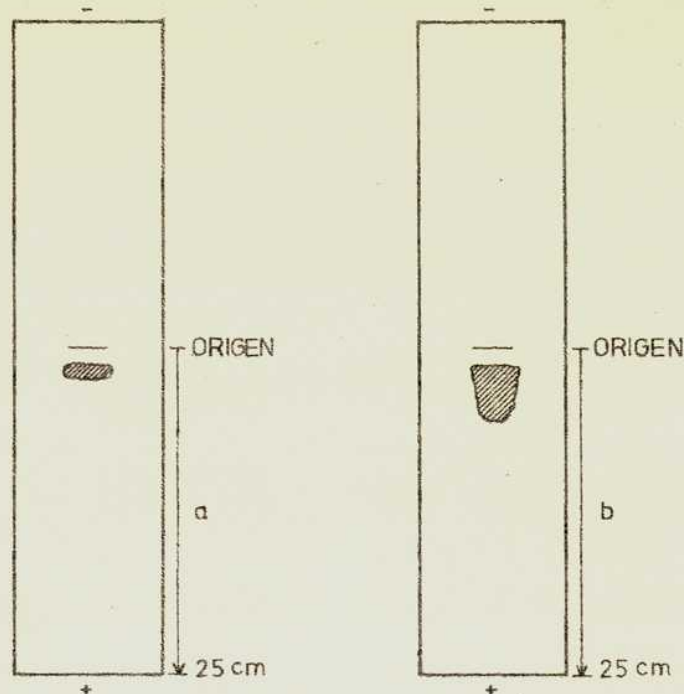


Figura 23. Dibujo de las corridas obtenidas por electroforesis sobre papel de fibra de vidrio de las fracciones HA₁ (a) y HA₁₀ (b), en KOH 30 % a 80 volts durante 80 minutos.

Tabla 33. Determinación de la homogeneidad de la fracción HA por disolución fraccionada con soluciones de hidróxido de potasio.

Fracción	Recuperación (%)	Nitrógeno (%)	$\left(\frac{\alpha}{\beta}\right)_D$	Nitoxilo ^a (%)	Proporciones relativas de los azúcares ^b		
					Ara	XII	Hexosas
HA ₁₀	18,6	4,3	-27,7 (c 0,2, KOH 30%)	0 ^d	F	M	F
HA ₁₅₁	2,1	0,6	-c				
HA ₁₅	12,3	0,4	-26,5 (c 0,2, KOH 30%)	2,0	F	M	F
HA ₂₀₁	2,5	1,1	-c				
HA ₂₀	8,0	0,7	-26,5 (c 0,2, KOH 30%)	1,8	F	D	M
HA ₂₅	11,4	1,2	-9,9 (c 0,3, KOH 30%)		F	D	D
HA ₃₀	9,9	1,5	+ 6,3 (c 0,04, KOH 30%)	2,3	F	M	M
HA ₁	34,1	0,7	-c				
Total	98,9						

^a Calculado sobre la parte de hidratos de carbono.

^b Se determinaron por cromatografía en papel (solvente 3, reactivo b). En ésta y las subsiguientes Tablas los símbolos indican las proporciones relativas de las manchas cromatográficas: F= fuerte, M= mediana, D= débil, T= trazas y 0= no detectado.

^c Insoluble.

^d Ver nota h, Tabla 27.

del cual aún se obtuvo una fracción insoluble (HA₁). Los extractos alcalinos se dializaron hasta neutralidad y se observó precipitación en el caso de las fracciones HA₁₅ y HA₂₀. Los porcentajes de recuperación y las propiedades generales están indicadas en la Tabla 33. La composición cuali y cuantitativa en monosacáridos figura en la Tabla 34.

Cuando se graficaron los porcentajes de hemicelulosa A solubi-

Tabla 34. Composición en monosacáridos y proteínas de las fracciones obtenidas por disolución fraccionada de HA.

Componente ^a	Fracciones		
	HA ₁₀	HA ₂₀	HA ₃₀
Arabinosa	42,7	51,5	33,2
Fucosa	8,7	7,5	6,0
Xilosa	7,5	5,1	8,2
Manosa	16,5	6,0	15,8
Galactosa	7,6	9,9	7,2
Glucosa	3,3	3,4	5,9
Acido galacturónico	8,3	ND	ND
Acido glucurónico	0	2,3	Tr
Glucosamina	5,4	14,3	22,7
Proteína ^b	25,4	≈ 0	2,3

^a Los resultados se expresaron de la siguiente manera: monosacáridos, moles %; proteínas, g/100g.

^b % Nitrogeno proteico x 6,25 (N proteico = N total - N aminoazúcares)..

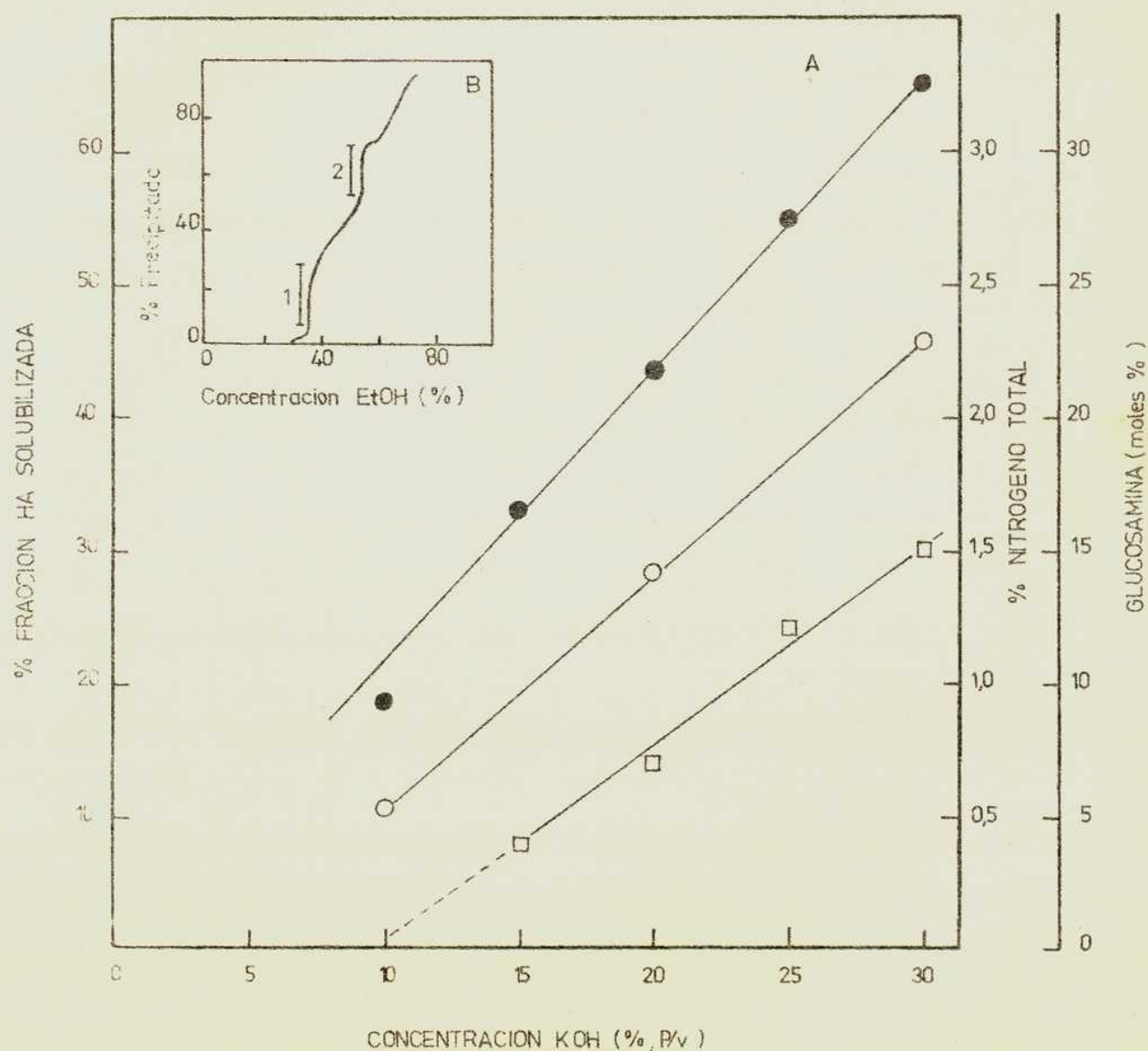


Figura 24. A, disolución fraccionada de la hemicelulosa A con KOH (% fracción solubilizada (●); % nitrógeno total (□); moles % glucosamina (○); B, heterogeneidad de la hemicelulosa B de maíz determinada por precipitación fraccionada con etanol (Whistler y Lauterbach, 1958).

lizada en función de la concentración de la solución alcalina usada (Figura 24), se obtuvo una línea recta; la misma proporcionalidad se observó para el contenido en nitrógeno total y en glucosamina.

Por último, cabe mencionar que la hemicelulosa A resultó también insoluble (apreciación visual) en dimetilsulfóxido, solvente usado para la extracción de las hemicelulosas de maderas (Timell, 1960) y en otros solventes potenciales para hidratos de carbono como la N-metil-2-pirrolidona.

HIDROLISIS ACIDA PARCIAL

Estudios preliminares

I) Utilizando ácido sulfúrico 0,01 N no se detectó por cromatografía sobre papel (solvente 3, reactivo b) la presencia de productos de degradación (monosacáridos u oligosacáridos). Cuando la concentración del ácido se elevó a 0,05 N, se observó la liberación de arabinosa y de oligosacáridos que revelaban fundamentalmente como aldopentosas. El hidrolizado se dializó para eliminar la arabinosa libre, y los oligosacáridos se sometieron a hidrólisis ácida total (método 1), con lo que se observó nuevamente la presencia de arabinosa como único azúcar neutro.

II) Se repitió la hidrólisis en las condiciones indicadas (ácido sulfúrico 0,05 N), se tomaron alícuotas del sobrenadante a intervalos regulares de tiempo y se determinó la concentración de los azúcares totales solubilizados en el mismo (reactivo de fenol ácido-sulfúrico). Se observó (Figura 25) que durante los 20 primeros minutos se obtiene un 85 % del hidrolizado total y que la hidrólisis se estabilizó a los 55 minutos. En este momento el porcentaje del producto solubilizado (Tabla 35) fue del 27 % y el análisis cromatográfico reveló la presencia

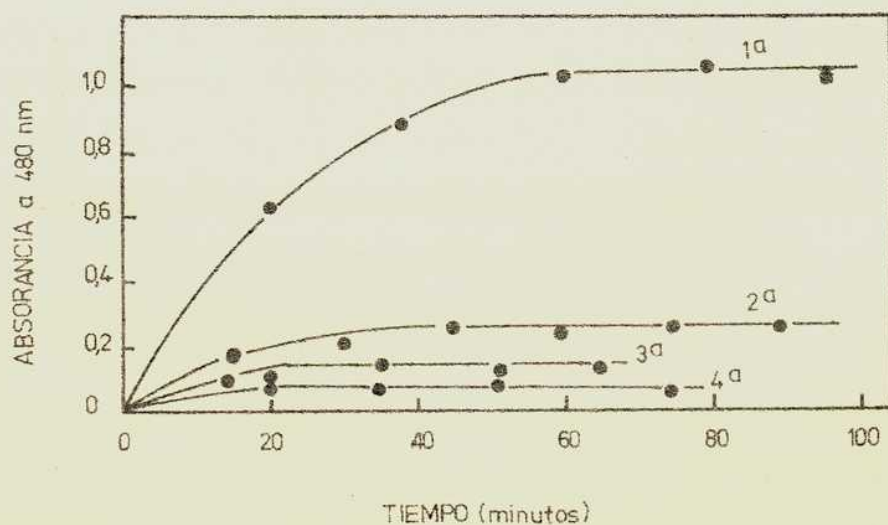


Figura 25. Hidrólisis ácidas parciales consecutivas (ácido sulfúrico 0,05 N) de la fracción HA.

Tabla 35. Hidrólisis ácida parcial (ácido sulfúrico 0,05 N) de la fracción HA.

Fracción	Rendimiento ^a (%)	Proporciones relativas de los azúcares ^b			
		Ram	Ara	Xil	Hexosas
Hidrolizado 1	27,0	0	F	D	D
Hidrolizado 2	7,2	0	M	D	D
Hidrolizado 3	3,3	0	D	D	D
Hidrolizado 4	1,7	0	D	D	D
Degradada insoluble	50,0	0	T	M	D

^a Cuando se llevó a cabo la hidrólisis preparativa se recuperó el 6,4 % en el precipitado de las sales de bario.

^b Detectados por cromatografía sobre papel y placa delgada (solvente 3, reactivo a).

de fuertes cantidades de arabinosa junto con pequeñas cantidades de xilosa y hexosas.

El insoluble remanente se sometió a las mismas condiciones ácidas y se obtuvo en los primeros 15 minutos un 20 % de hidrólisis (respecto de la primera hidrólisis), que alcanzó un 26 % a los 45 minutos, manteniéndose luego constante. De esta forma se solubilizó un 7 % de una mezcla constituida (Tabla 35) principalmente por arabinosa, y cantidades menores de xilosa y hexosas. El nuevo insoluble obtenido se sometió dos veces consecutivas al mismo tratamiento, con lo que se obtuvieron porcentajes de hidrólisis del 13 % y 6 % respectivamente (respecto de la primera hidrólisis) y de solubilización (Tabla 35) del 3,3 % y 1,7 % respectivamente, y liberación de pequeñas cantidades de arabinosa, xilosa y hexosas.

La hidrólisis ácida total (método 2) del polisacárido degradado insoluble (Tabla 35) indicó la presencia de arabinosa sólo en forma de trazas.

Durante las hidrólisis ácidas parciales se observaron también productos de mayor peso molecular que en cromatografía en placa delgada revelaron desde el punto de siembra hasta la mancha de las hexosas.

Hidrólisis ácida parcial (ácido sulfúrico 0,05 N) preparativa.

En función de los resultados anteriores, se llevó a cabo la hidrólisis ácida parcial preparativa y se obtuvieron cuatro fracciones. El polisacárido degradado insoluble (fracción a: rendimiento 27 % y 34 % (dos hidrólisis distintas), nitrógeno 6,0 %, ácidos urónicos 12,4 %) se separó; la solución sobrenadante se neutralizó y se llevó a seco. El precipitado de las sales de bario se extrajo sucesivamente con solución saturada de sulfato de sodio a temperatura ambiente y a

60 C, obteniéndose productos solubles que se recuperaron por diálisis y liofilización (fracción b: rendimientos 2,6 % y 3,8 %, nitrógeno 9,2 % y 8,3 %, respectivamente).

El sobrenadante llevado a seco se trató con etanol 33 %, obteniéndose en esta forma una fracción soluble en agua e insoluble en etanol (fracción c: rendimiento 30 % y 18 % (dos hidrólisis distintas), nitrógeno 4,4 %, ácidos urónicos 8,6 %) y una fracción soluble en etanol 33 % (fracción d: rendimiento 10,4 % y 35 % (dos hidrólisis distintas), proteínas 6,6 %).

Las fracciones a, b y c fueron hidrolizadas y los productos resultantes analizados por cromatografía gaseosa (Tabla 36). La fracción c, sin hidrolizar, no mostró por cromatografía sobre papel (solventes 3 y 7, reactivos b y g) la presencia de monosacáridos ni aminoácidos, u otros componentes de bajo peso molecular, salvo una mancha continua desde el origen hasta la mancha de ácido galacturónico (reactivo b). La fracción d, disuelta en agua, se cromatografió sobre Sephadex G-25 (25 x 1,2 cm) y el análisis de cada tubo (2,7 ml) indicó (solvente 3, reactivo a) que no había hidratos de carbono de tamaño mayor al del monosacárido y que la mezcla obtenida estaba constituida fundamentalmente por arabinosa, con sólo trazas de xilosa y galactosa.

Tabla 36. Composición en monosacáridos de las fracciones obtenidas por hidrólisis ácida parcial (ácido sulfúrico 0,05 N) de la fracción HA (moles %).

Monosacárido	HA	a	b		c
			t.a.	60 C	
Arabinosa	34,2	7,2	34,9	34,8	21,6
Fucosa	2,9	4,8	0	2,8	1,9
Xilosa	7,9	8,4	9,9	5,7	6,1
Manosa	16,3	44,0	5,0	9,1	40,4
Galactosa	6,4	10,0	16,6	1,1	9,0
Glucosa	3,0	16,8	5,2	1,8	7,0
Acido galacturónico	22,8	8,9	16,5	28,8	11,4
Acido glucurónico	0	0	4,2	6,0	0
Glucosamina	6,5	0	7,8	9,9	2,6

Determinación del grado de polimerización de las fracciones

Se procedió en la forma indicada en la técnica general y de un gráfico de los valores obtenidos en función del tiempo se obtuvo, por extrapolación, el valor del formaldehído producido. A partir de este dato se calculó el peso molecular para la parte de polisacárido de la fracción y tomando el peso de la "unidad anhidro promedio", obtenido de la composición en monosacáridos del mismo, se determinó el grado de

polimerización correspondiente. Los resultados figuran en la Tabla 37.

Tabla 37. Determinación del grado de polimerización de la fracción HA y de las obtenidas por hidrólisis ácida parcial.

Fracción	Peso molecular ^a	Grado de polimerización ^b
HA	5.960 ó 11.920	39 ó 78
a	1.140 ó 2.280	7 ó 14
c	4.510 ó 9.020	29 ó 58

^a Según sea $y=1$ ó $y=2$ (ver Parte Experimental).

OXIDACION CON PERIODATO DE HA

La oxidación con periodato de la fracción HA (Figura 26) mostró un consumo de 1 mol de periodato cada 210 g de polisacárido (en éste y los siguientes cálculos se ha descontado el porcentaje de proteína). Si de acuerdo a la composición del mismo (Tabla 27) se calcula que el peso de la "unidad anhidro promedio" es de 152, se obtiene un consumo de 1,4 moles de unidad por mol de periodato. El análisis del

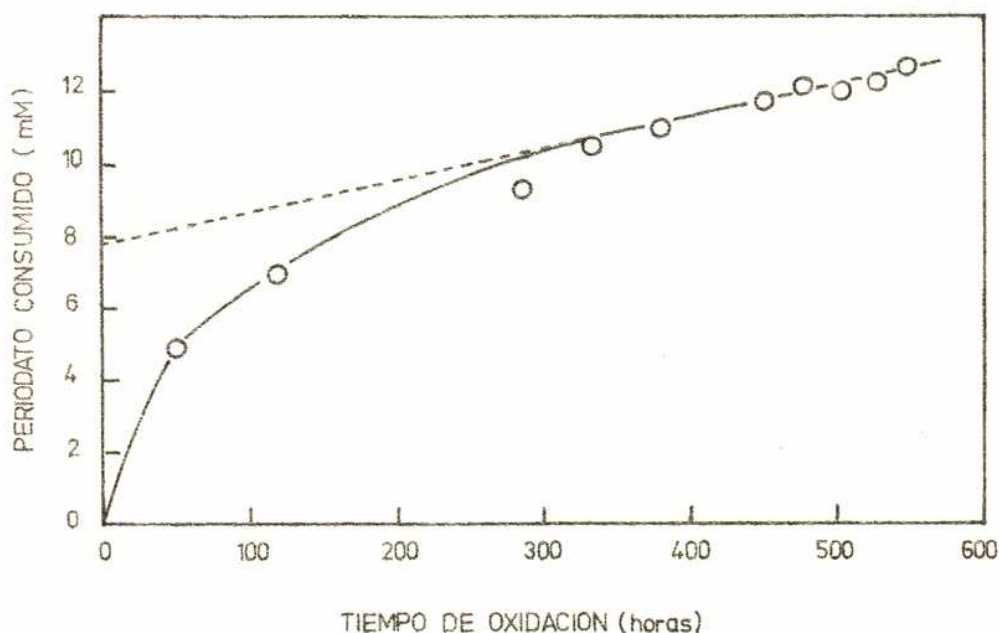


Figura 26. Determinación del consumo de periodato de la fracción HA. (Una suspensión con la misma concentración de HA en agua acidificada a pH 4, no mostró absorción a la longitud de onda utilizada (ver Parte Experimental)).

polialcohol, que se recuperó con un rendimiento del 87 % respecto del producto de partida, proveniente de la reducción del oxopolisacárido, indicó la desaparición de arabinosa, fucosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosamina, y la presencia de glucosa y ácido galacturónico en porcentajes molares de 28,6 % y 62,9 % respectivamente junto con un bajo porcentaje (8,5 %) de arabinosa. Dado que el dosaje absoluto de ácido urónico en el polialcohol dio valores entre 9 % y 6,5 %, descontando

el 50 % y el 30 % de proteína respectivamente, frente al 25,5 % en el producto original, la oxidación destruyó entre el 65 % y 75 % del ácido galacturónico. Por otra parte, el porcentaje de glucosa remanente (3 a 4 %) comparado con el inicial (2 a 3 %) indicó que las unidades de glucosa no son oxidadas. De estos datos se puede calcular que aproximadamente el 90 % de los azúcares fueron oxidados.

Cabe mencionar que tanto el oxopolisacárido como el polialcohol resultante de su reducción son insolubles, al igual que el producto de partida, y en consecuencia todas las reacciones se llevaron a cabo en sistemas bifásicos.

El polialcohol fue sometido a una degradación por el método de Smith, consistente en una hidrólisis ácida suave (ácido trifluoracético 0,1 N, 18 horas a temperatura ambiente). Al cabo de la misma se obtuvo un remanente insoluble del 10 %. La parte soluble mostró un contenido en proteínas aproximado del 12 % (absorción a 280 nm) y analizada por cromatografía gaseosa presentó sólo trazas de azúcares neutros (arabinosa, fucosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa en relación molar 4:10:2:4:2:3).

OXIDACION CON PERIODATO DE LA FRACCION a DE LA HIDROLISIS ACIDA PARCIAL DE LA FRACCION HA.

La oxidación con periodato de la fracción a (Figura 27) proveniente de la hidrólisis furanósica de HA, mostró un consumo de 1 mol de periodato cada 324 g de polisacárido, que corresponde aproximadamente a 1 mol de periodato cada 2,1 unidades anhidro promedio de peso molecular 158. El análisis del oxopolisacárido reducido, que se recuperó con un rendimiento del 93 %, se llevó a cabo por cromatografía gaseosa de los azúcares componentes (Tabla 38).

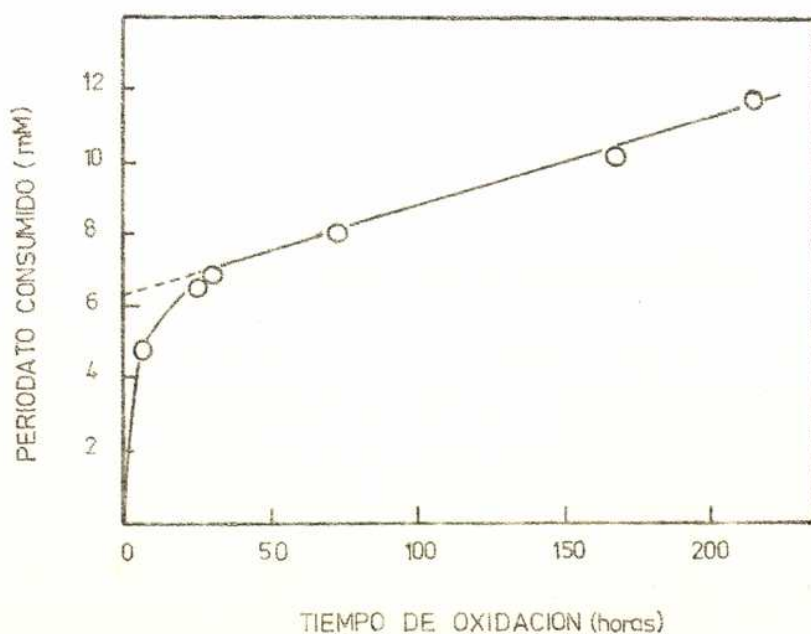


Figura 27. Determinación del consumo de periodato de la fracción a.

Tabla 38. Composición en monosacáridos de los oxopolisacáridos reducidos de las fracciones HA y a (moles %).

Monosacárido	HA	fracción a		
		Oxidación ^a total	Oxidación incompleta	
			Insoluble	Soluble
Arabinosa	8,5	0	4,5	1,6
Fucosa	0	5,9	12,2	5,1
Xilosa	0	3,7	2,9	8,7
Manosa	0	4,7	10,2	44,5
Galactosa	0	0	13,8	4,6
Glucosa	28,6	82,1	44,6	25,0
Acido galacturónico	62,9	0	1,1	10,4
Glucosamina	0	3,5	2,6	10,0

^a Por diferencia con el polisacárido sin oxidar (Tabla 36), se calcularon para este oxopolisacárido reducido las relaciones molares (Man + Gal/Xil + Ara) oxidadas y (Eri + Trei/Gli), observándose concordancia de datos (3,40 y 3,44, respectivamente; manosa, galactosa y xilosa provienen de uniones (1→4)- y arabinosa de uniones (1→5)-).

Cuando el polialcohol fue hidrolizado (método 2) y la mezcla cromatografiada sobre papel (solvente 3), sólo se observó la presencia de glucosa junto con productos que corrían más lentamente. Uno de ellos (R_{Xil} 0,61) corría como genciobiosa mientras que los otros evidenciaban un grado de polimerización mayor de 2.

Usando el solvente 2 como solvente de desarrollo y xilosa como referencia, se corrieron cromatografías a fin de relacionar la movilidad con el grado de polimerización. Los datos obtenidos (Tabla 39) fueron diagramados en la Figura 28.

Tabla 39. Relación entre la movilidad y el grado de polimerización de los oligosacáridos del oxopolisacárido reducido de la fracción a.

Oxidación total				Oxidación incompleta			
Oxopolisacárido reducido		Degradación de Smith		Soluble		Insoluble	
R _{Xil} ^a	y ^b	R _{Xil} ^a	y ^b	R _{Xil} ^a	y ^b	R _{Xil} ^a	y ^b
0,50	0,00	0,47	0,05	0,39	0,19	0,32	0,33
0,42	0,14	0,37	0,23	0,33	0,31	0,22	0,56
0,34	0,29	0,21	0,59	0,23	0,53	0,16	0,77
				0,13	0,83		

^a Promedio de dos a tres cromatografías.

^b $y = \log \left(\frac{1}{R_{Xil}} - 1 \right)$.

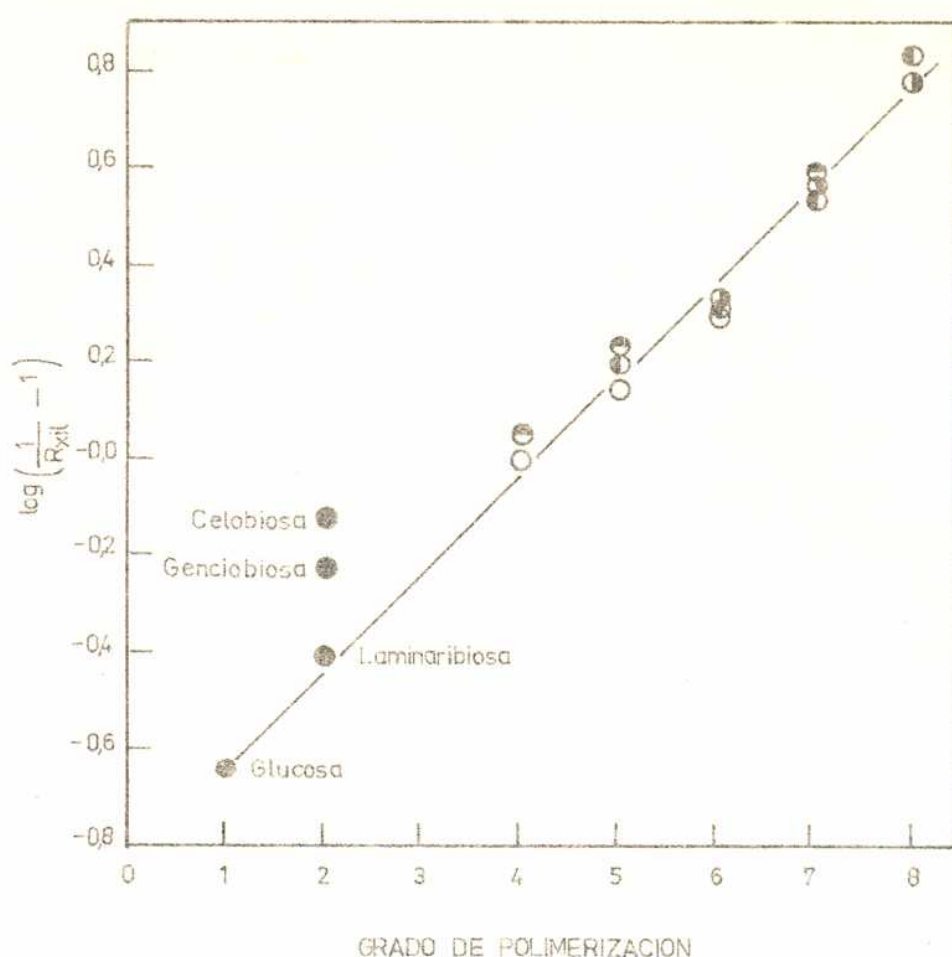


Figura 28. Relación entre la movilidad y el grado de polimerización de los oligosacáridos del carbohidrato reducido de la fracción a. Oxidación total, polialcohol (○) y polialcohol degradado por hidrólisis de Smith (●); oxidación incompleta, fracción soluble (◐) y fracción insoluble (◑). La ecuación de la recta se calculó por el método de los cuadrados mínimos con los valores promedio de R_{Xi} para cada oligosacárido, exceptuando los obtenidos por hidrólisis de Smith.

En ella se ve que los tres productos de hidrólisis forman una serie de oligómeros que no corresponden a la familia de la gencibiosa (uniones β -(1→6)) ni tampoco a la de la celobiosa (uniones β -(1→4)). El disacárido cuyo R_{Xi} da valores que pertenecen a la recta con un grado de polimerización de 2, es la laminaribiosa (uniones β -(1→3)) y los puntos alineados entran en la ecuación determinada previamente para esta familia (Mazzini y Gerez, 1973).

El polialcohol fue sometido a una degradación por el método de Smith, consistente en una hidrólisis ácida suave (ácido sulfúrico 0,1 N, 18 horas a temperatura ambiente) por la cual se hidrolizan las uniones acetálicas formadas por los restos de los azúcares oxidados y no las glicosídicas de los azúcares resistentes a la oxidación. Al cabo de la misma se obtuvo un remanente insoluble del 10 %. La cromatografía sobre papel del sobrenadante (solvente 3) indicó nuevamente la presencia de oligosacáridos pertenecientes a una misma serie y cuando los valores se dispusieron sobre la recta de las uniones β -(1→3)- sólo se desviaron ligeramente de la misma (Figura 28), posiblemente debido al glice-

. rol terminal.

La oxidación con periodato de sodio se repitió determinándose en este caso no sólo el periodato consumido sino también el ácido fórmico producido (Figura 29). Como puede verse la recta de sobreoxidación comienza, para ambas determinaciones, a las 4-5 horas, mientras que en la oxidación anterior (Figura 27) recién se iniciaba aproximadamente a las 20 horas. Se obtuvo también un menor consumo de periodato que en el caso anterior (515 g polisacárido por mol de periodato, es decir 1 mol de periodato cada 3,3 unidades anhidro promedio). La producción de ácido fórmico fue de 1 mol cada 1200 g de polisacárido, que corresponde a 1 mol de ácido fórmico cada 7,6 unidades anhidro promedio, y la relación de moles de periodato a moles de ácido fórmico fue de 2,3.

El oxopolisacárido se redujo con borohidruro de sodio y se obtuvo un remanente insoluble del 50 % y una fracción soluble también del 50 %. Ambos productos contenían cantidades similares de proteínas (34,3 % y 33,1 % respectivamente). La composición en monosacáridos de los mismos (Tabla 38), comparada con la del producto de la anterior

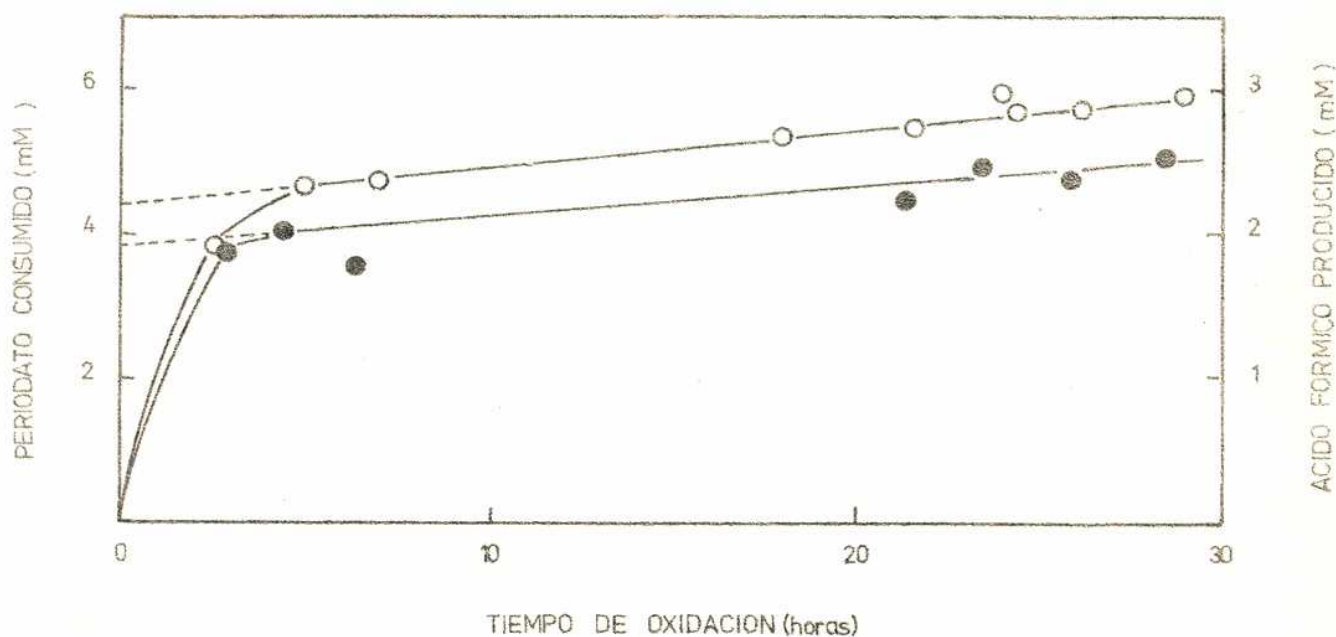


Figura 29. Determinación del consumo de periodato y del ácido fórmico producido de la fracción a (oxidación incompleta). Periodato consumido (o); ácido fórmico producido (s).

oxidación, muestra que, de acuerdo con los valores analíticos, esta oxidación ha sido incompleta. Por hidrólisis (método 2) y cromatografía sobre papel (solvente 1) se detectaron, además de los azúcares esperados, oligómeros que pertenecen a la misma familia que los obtenidos en la hidrólisis del producto totalmente oxidado (Tabla 39 y Figura 28).

Estas dos fracciones, soluble e insoluble, fueron reoxidadas (Figura 30) volviendo a consumir periodato, lo que confirmó la oxida-

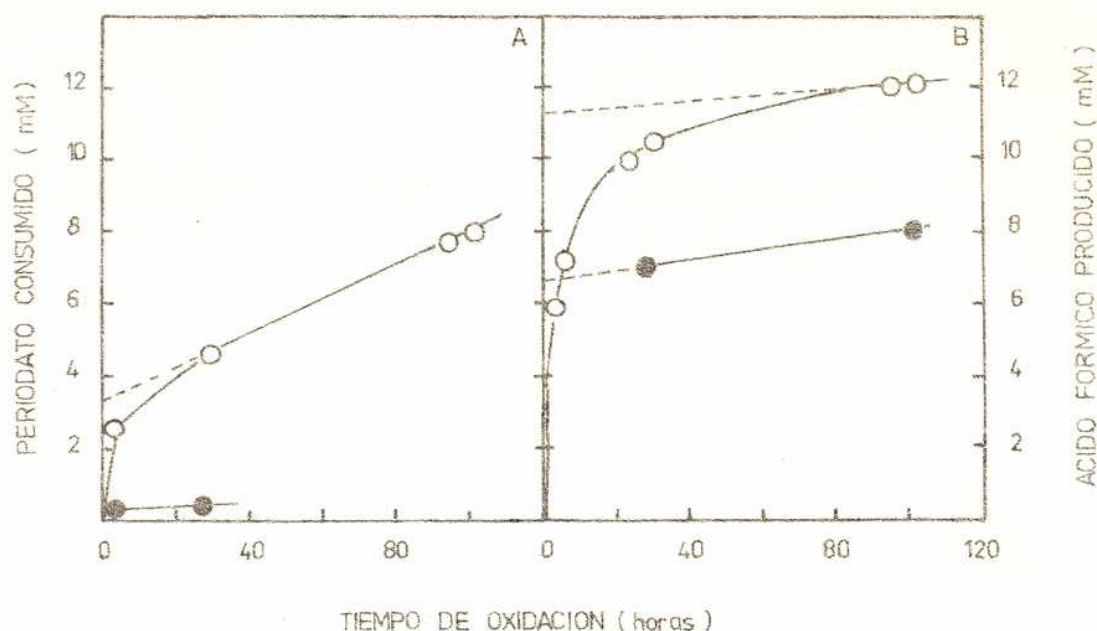


Figura 30. Oxidación exhaustiva con periodato de la fracción a (oxidada previamente). A, fracción insoluble; B, fracción soluble. Periodato consumido (o); ácido fórmico producido (e).

ción incompleta producida en el paso anterior (Figura 29). La fracción insoluble mostró un consumo de 1 mol de periodato cada 625 g de polisacárido, correspondiente a 1 mol de periodato cada 4 unidades anhidro promedio, sin que se formaran cantidades significativas de ácido fórmico. En cambio el consumo de periodato en la fracción soluble fue mayor (1 mol de periodato cada 180 g de polisacárido, es decir cada 1,1 a 1,2 unidades anhidro promedio) y se produjo ácido fórmico (1 mol cada 313 g de polisacárido, que corresponde a 2,0 unidades anhidro promedio).

H E M I C E L U L O S A B

PROPIEDADES GENERALES

La hidrólisis ácida total (método 1) de varias fracciones provenientes de distintas extracciones produjo, en todos los casos, mezclas de azúcares sustancialmente similares (cromatografía sobre papel y placa delgada, apreciación visual). Las fracciones mostraron arabinosa como principal componente, xilosa, una mezcla de hexosas y ácidos urónicos. En estas condiciones no se detectaron cetosas (solventes 3 y 5, reactivo d) ni aminoazúcares (solvente 3, reactivo f).

La fracción HB seleccionada para los estudios posteriores contenía 7,5 % de nitrógeno (proteínas 46,9 %) y 12,1 % de ácidos urónicos (porcentajes calculados sobre la parte de hidratos de carbono), y un poder rotatorio $[\alpha]_D -32,5$ (c 0,2, NaOH 0,1 N).

La electroforesis en medio alcalino (KOH 30 %) sobre papel de fibra de vidrio (Figura 31) mostró dos bandas anchas, diferenciadas, una de las cuales permanecía en el origen.

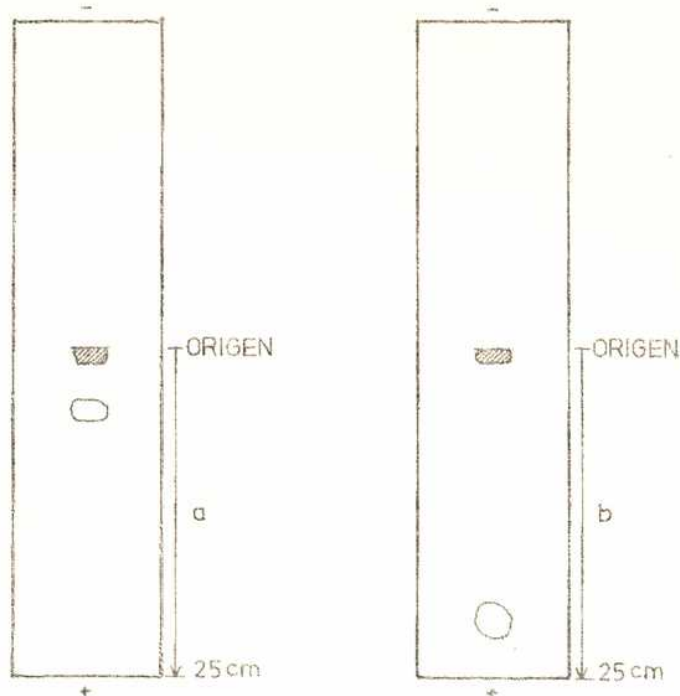


Figura 31. Dibujo de las corridas obtenidas por electroforesis sobre papel de fibra de vidrio de la fracción H₂, en KOH 30 % a 80 volts durante 80 minutos (a) y a 160 volts durante 120 minutos (b).

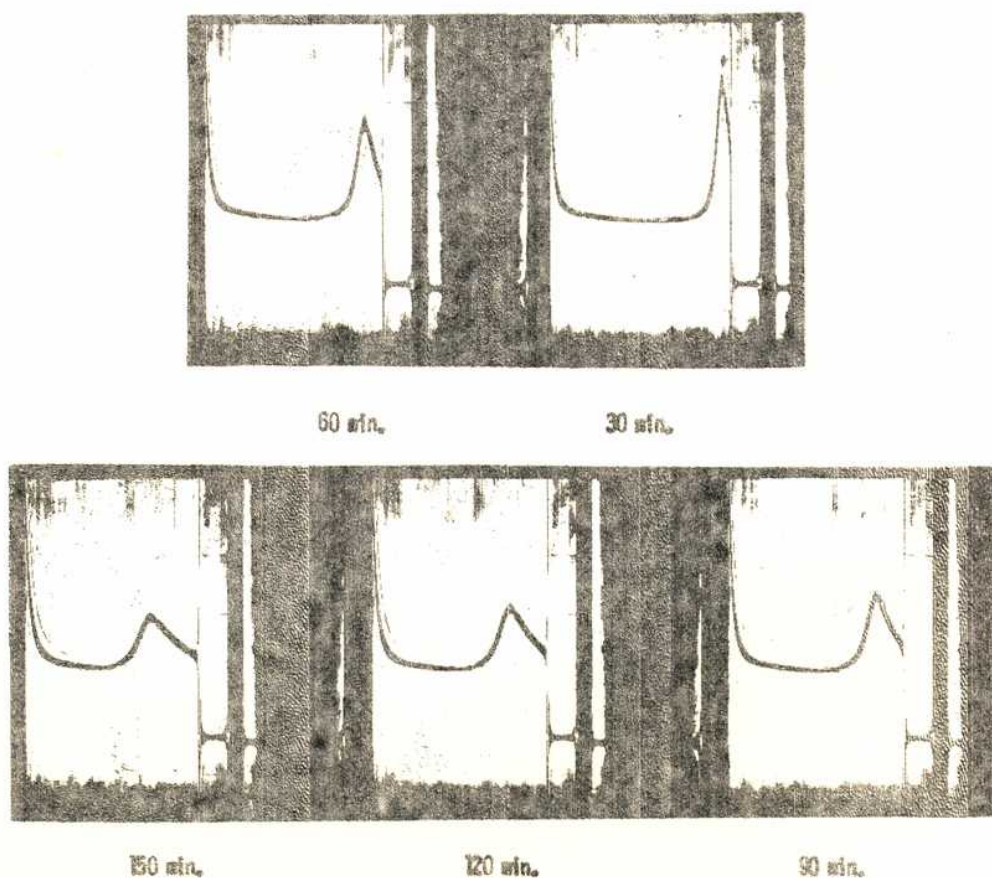


Figura 32. Ultracentrifugación de la fracción H₂. Las placas se obtuvieron con una solución 1,0 % en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 r.p.m. y las fotos fueron tomadas a los 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de llegar a la velocidad indicada. Las placas obtenidas a las demás concentraciones (0,35 %, 0,5 % y 0,7 %) son similares y no fueron incluidas por razones de espacio.

FRACCIONAMIENTO. PROPIEDADES DE LAS FRACCIONES.

Al intentar purificar la fracción HB repitiendo el procedimiento que condujo a su aislamiento, esto es solubilización en agua a pH neutro y reprecipitación por agregado de etanol, se encontró que una parte de la misma era insoluble (fracción HB₁, 12 %). Cuando la disolución se llevó a cabo en agua acidificada con ácido acético 50 % a pH 5, el porcentaje de insoluble resultó menor (fracción HB₁, 6 %).

En vista de estos resultados se resolvió continuar el fraccionamiento para obtener datos sobre la heterogeneidad de HB. Así en lugar de precipitar la solución remanente con etanol, según el método de aislamiento original, se acidificó nuevamente hasta pH 3 y se obtuvo un nuevo insoluble (fracción HB₂, 22 %). La solución sobrenadante se precipitó con etanol (fracción HB₃, 42 %) y las aguas madres se concentraron y liofilizaron (fracción HB₄, 36,6 %). Operacionalmente las fracciones HB₁ y HB₂ quedarían encaadradas dentro de la definición original de hemicelulosa A, mientras que la HB₄ se podría considerar como hemicelulosa C, y solamente las fracciones HB₂ y HB₃ deberían ser consideradas como hemicelulosa B.

La hidrólisis ácida total (método 1) de las fracciones obtenidas mostró resultados análogos a los obtenidos con la HB original aún cuando HB₃ presentó una mayor proporción de hexosas y ácido urónico. Este último fue tentativamente identificado por cromatografía sobre papel como ácido galacturónico. En las cromatografías no se observaron manchas coincidentes con la del testigo de ácido 4-O-metilglucurónico. La determinación de ácido siálico por el método de Warren (1959) dio valores dentro del margen de error experimental. La fracción HB₃ resultó, asimismo, homogénea por ultracentrifugación a varias concentraciones (0,35 %, 0,5 %, 0,7 % y 1 %) dando un único pico (Figura 32) que al ensancharse se presenta como no simétrico; su coeficiente de sedimentación a dilución infinita, calculado por extrapolación, fue de $1,8 \times 10^{-13}$. Las corridas efectuadas con la fracción HB₄ al 0,8 % en cloruro de sodio 0,1 M no mostraron la formación de picos.

En la Tabla 40 se dan los rendimientos y algunas propiedades de las fracciones obtenidas.

La posibilidad de existencia de cadenas lineales en HB (ver Oxidación con periodato de HA, pág. 127) sugirió la aplicación del método de Gaillard (1961) a esta fracción, es decir, la precipitación de los polisacáridos lineales por formación de complejos insolubles con iodo en un medio acuoso conteniendo cloruro de calcio.

Tabla 40. Determinación de la homogeneidad de la fracción HB.

Fracción	Recuperación (%)	$\left[\frac{\alpha}{\alpha}\right]_D^{25}$	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Hexosas ^a (%)	Ácido hexo-urónico(%) ^a	Proporciones relativas de los azúcares ^b		
							Ara	Xil	Hexosas ^c
HB ₁	6,0	-62,5 ^d	1,9	11,9	ND	ND	F	M	0
HB ₂	22,0	-75,0 ^d	11,5	71,9	12,7	15,5	M	F	0
HB ₃	42,0	-78,0 ^e	4,2	26,3	24,2	5,7	M	M	0
HB ₄	36,6	-20,3 ^e	8,1	50,6	4,2	5,2	M	F	0
Total	106,6								

^a g/100 g de hidratos de carbono, determinado por el método del carbazol (Galanbos, 1967) y expresados como D-glucosa y ácido D-galacturónico respectivamente.

^b Se determinaron por cromatografía en papel (solvente 3, reactivo b).

^c Mezcla no resuelta (manosa, galactosa y glucosa).

^d Determinaciones efectuadas en KOH 0,1 N, c 0,2.

^e Determinaciones efectuadas en agua, c 0,2 a 0,4.

Para ello HB se disolvió en una solución acuosa de cloruro de calcio, quedando un residuo insoluble (fracción HB_i: 18,9 %, nitrógeno 6,5 %) que fue separado. El agregado de iodo produjo un precipitado par do que se separó y se descompuso con solución de tiosulfato; la precipi tación con etanol (concentración final 75 %) de la solución dializada y concentrada permitió obtener HB_{1i}, y por liofilización del sobrenadante, HB_{1s}.

De las aguas madres originales, tratadas con tiosulfato y diali zadas, se obtuvo por precipitación con etanol (concentración final 75 %) la fracción HB_{ri}, y por liofilización, HB_{rs}.

Se recuperó sólo el 52,7 % del producto soluble inicial y se ob servó que las aguas de diálisis daban una reacción fuertemente positiva de hidratos de carbono (reactivo de fenol-ácido sulfúrico). La Tabla 41 muestra los rendimientos de las fracciones y algunas de sus propiedades.

Tabla 41. Fraccionamiento de HB por precipitación con iodo en presencia de cloruro de calcio.

Fracción	Recuperación ^a (%)		$\left[\frac{\alpha}{\alpha}\right]_D^{25}$ ^b	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Hetoxilo ^c (%)
HB _{1i}	17,6	11,3	-37,6	12,2	76,3	2,5
HB _{1s}	3,7	6,0	+14,1	4,7	29,4	2,5
HB _{ri}	71,9	74,2	-12,1	5,2	32,5	0 ^d
HB _{rs}	6,8	8,6	-13,1	3,5	21,9	1,2

^a Respecto del producto soluble inicial (dos fraccionamientos distintos).

^b Determinaciones efectuadas en agua, c 0,04 a 0,2.

^c Calculado sobre la parte de hidratos de carbono.

^d Ver nota h, Tabla 27.

El análisis cuantitativo de los monosacáridos de HB_i, HB_{ri} y HB_{li} figura en la Tabla 42 y el de aminoácidos en la Tabla 43.

Las fracciones HB_{ri} (Figura 33) y HB_{li} resultaron homogéneas por ultracentrifugación y los coeficientes de sedimentación (S_{20,w}) fueron de 1,24 x 10⁻¹³ y 1,39 x 10⁻¹³, respectivamente (c 0,8 %).

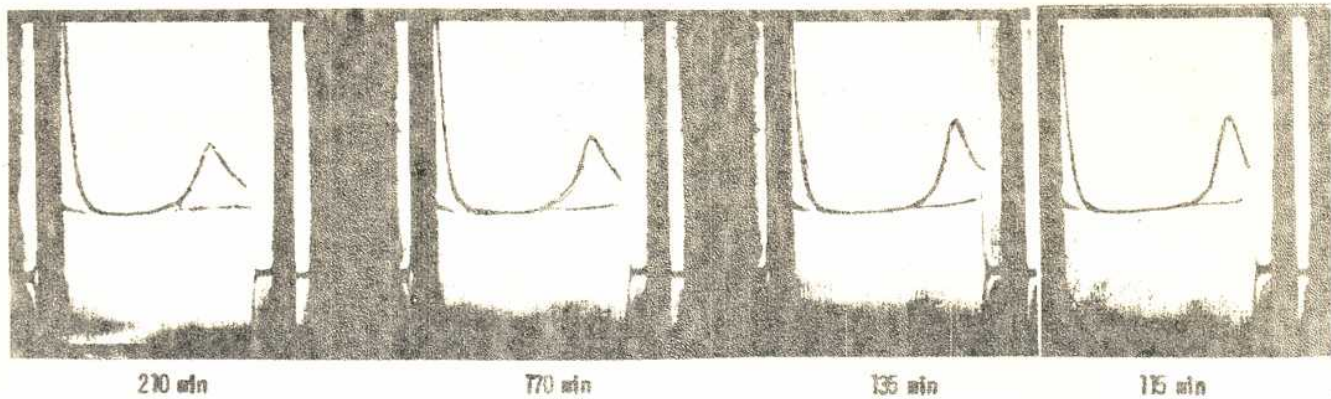


Figura 33. Ultracentrifugación de la fracción HB_{ri}. Las placas se obtuvieron con una solución 0,8 % en cloruro de sodio 0,1 M a 47.660 r.p.m. y las fotos fueron tomadas a los 115, 135, 170 y 210 minutos después de llegar a la velocidad indicada.

Tabla 42. Composición en monosacáridos de las fracciones obtenidas por fraccionamiento de HB. (moles %).

Monosacárido	HB _i	HB _{ri}	HB _{li}
Arabinosa	70,7	32,4	43,3
Fucosa	12,5	4,6	9,1
Xilosa	2,9	22,6	13,8
Manosa	2,8	16,5	8,7
Galactosa	1,8	7,0	7,3
Glucosa	0	1,9	1,7
Acido galacturónico	4,8	17,8 ^a	8,6
Glucosamina	4,2	2,5	7,4

^a El ácido hexurónico se determinó por descarboxilación (Barker y col., 1958).

Tabla 43. Composición en aminoácidos de las fracciones obtenidas por fraccionamiento de HB (g/10g H).

Aminoácido	HB _i	HB _{ri}	HB _{li}
Acido aspártico	70,5	7,6	8,4
Treonina	1,6	1,1	Tr
Serina	3,7	1,8	2,2
Acido glutámico	23,7	52,5	54,0
Prolina	7,4	ND ^a	ND ^a
Glicina	4,7	2,9	2,4
Alanina	6,2	1,8	2,3
Valina	6,2	1,4	2,2
Metionina	3,6	Tr	1,6
Isoleucina	6,6	1,2	1,6
Leucina	9,2	2,6	4,1
Tirosina	4,8	Tr	Tr
Fenilalanina	5,6	1,3	1,6
Lisina	6,7	3,9	4,7
Histidina	ND ^b	0	0
Arginina	ND ^b	21,8	14,1
Hidroxiprolina	0	4,0	0
Relación a/b	≤ 5,6	2,3	3,3

^a Oscurecido por el pico de ácido glutámico.

^b Oscurecido por el pico de amoníaco.

HEMICELULOSA C

PROPIEDADES GENERALES

Los rendimientos de HC en las distintas extracciones y en las variaciones de los procedimientos de extracción, figuran en la Tabla 25. Los porcentajes de nitrógeno de las fracciones obtenidas aparecen en la Tabla 26.

De todas las fracciones HC obtenidas se seleccionaron cinco a fin de completar su análisis con la determinación de azúcares totales, cenizas, etc. La selección se hizo de manera de tener fracciones HC de extracciones consecutivas sobre una misma muestra de semillas, por una parte, y de poder comparar, por otra, los productos de las primeras extracciones sobre distintas muestras de semillas.

Dada la compleja composición de la fracción HC, es evidente que el resultado de la determinación de azúcares totales será función del azúcar elegido como testigo, debido a que la reacción de cada uno de ellos con el reactivo de fenol ácido-sulfúrico no es idéntica. Se usaron tres testigos diferentes, dos monosacáridos: arabinosa, componente importante del polisacárido (Tabla 27) y glucosa, presente en muy pequeña proporción (Tabla 27); el tercer testigo fue una fracción de HB (HB₃) que contiene una composición similar a la de HC y un 26,3 % de proteína. Los resultados mostrados en la Tabla 44 indicaron que los dos monosacáridos son testigos equivalentes dentro del error experimental del método y que de HB₃ se obtienen valores superiores en todos los casos en un 25 %.

En la Tabla 44 se puede apreciar asimismo la heterogeneidad de las fracciones HC. Varios datos llaman la atención: la retención de ma-
Tabla 44. Propiedades de la hemicelulosa C extraída de las semillas de *Gleditsia triacanthos*.

Hemicelulosa C ^a	g ^b	Hidratos de carbono totales ^c			Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
		I	II	III			
1C (1a.)	1,0	9,6	10,5	13,4	11,1	69,4	10,4
2C (1a.)	0,2	15,9	17,6	22,4	3,4	21,3	35,0
3C (1a.)	0,06	12,6	13,9	17,7	1,9	11,9	52,0
1C (2a.)	2,9	46,1	50,8	64,7	7,7	48,1(53,1) ^d	2,7
1C (3a.)	2,8	16,6	18,3	23,3	9,3	58,1	ND

^a Los números entre paréntesis indican la extracción a la que pertenecen (ver Tabla 25).

^b Respecto de la semilla entera.

^c Determinado por el método de Dubois y col. (1956) y expresados como arabinosa (I), glucosa (II) y fracción HB₃, descontado el porcentaje de proteínas (III).

^d Determinado por el método de Lowry y col. (1951) y expresado como albúmina.

terial inorgánico aumenta en las extracciones sucesivas de una misma muestra hasta llegar al 52,0 % en la tercera extracción y disminuye la cantidad de proteína; dentro de las fracciones obtenidas de la primera extracción sobre muestras distintas, se nota una variación del contenido en hidratos de carbono totales y, aunque algo menor, en proteínas.

Para el trabajo siguiente se eligió la fracción HC denominada 1C (2a.) (ver Tabla 44) por su alto contenido en hidratos de carbono y bajo contenido en cenizas; la misma contiene además un 2,2 % de material soluble en cloroformo, metanol 2:1, clasificado como "lípidos" de acuerdo al método de dosaje utilizado (ver Parte Experimental, pág.196), y un contenido en "lignina" (denominación también correspondiente al método empleado a tal efecto, ver Parte Experimental, pág. 195) no mayor del 3 %.

La composición cuantitativa en monosacáridos está dada en la Tabla 27 y la de aminoácidos en la Tabla 28. La fracción no contiene ácido siálico, así como tampoco hidroxiprolina o O-hidroxilisina.

HIDROLISIS ACIDA TOTAL

La mezcla obtenida por hidrólisis ácida total con ácido sulfúrico 1 N (método 1) fue dividida en dos partes: una de ellas se conservó tal cual y la otra se pasó a través de Amberlite IR-120(H⁺), separando de esta manera los azúcares neutros y ácidos (fracción A) de los aminoazúcares y aminoácidos (fracción B). Los resultados del análisis de ambas fracciones por cromatografía en papel y placa delgada, están dados en la Tabla 45.

Tabla 45. Hidrólisis ácida total de la fracción HC.

Fracción	Método	Rendimiento ^a	Proporciones relativas de los azúcares ^b					Aminoácidos y aminoazúcares ^c
			Xil	Ara	Glu	Hex. ^f	OHg.	
Hidrolizado sin purificar ^d	1	-	Tr	+	0	++	+	+
Hidrolizado ^d purificado	1	48	Tr	++	Tr	+	+	Tr
		52	0	0	0	0	0	+
Hidrolizado ^e purificado	3	-	Tr	++	+	++	+	

^a Porcentajes relativos de recuperación.
^b Detectados por cromatografía sobre papel y placa delgada.
^c Solvente 3 y reactivo g.
^d Solvente 3 y reactivo a.
^e Solvente 4 y reactivo a.
^f Mezcla no resuelta.

La distribución de los monosacáridos es idéntica en las fracciones purificada y sin purificar. En la fracción B no se detectaron hidratos de carbono y el dosaje de hexosas y pentosas por el método de Fernell y King (1953) dio valores que se encuentran dentro del margen de error del método ($< 1,2 \%$).

La eliminación de los aminoácidos y péptidos permitió apreciar en la fracción A la presencia de productos que revelaban como azúcares (reactivo c) y tenían menor movilidad que los monosacáridos. Al determinar la relación entre la movilidad y el grado de polimerización de los mismos, se encontró que podían disponerse sobre una recta (Figura 34, Tabla 46). A fin de confirmar este hecho y eliminar la posible interferencia de los monosacáridos, se separó la parte de oligosacáridos (fracción D) por medio de una cromatografía preparativa sobre papel y se volvió a analizar en el mismo solvente (reactivo c). Nuevamente se encontró la misma relación directa entre la movilidad y el grado de polimerización (Figura 34, Tabla 46) y coincidentemente, la pendiente de la recta en ambos casos resultó igual a la determinada para los oligosacáridos del oxopolisacárido reducido de la fracción a (Figura 28).

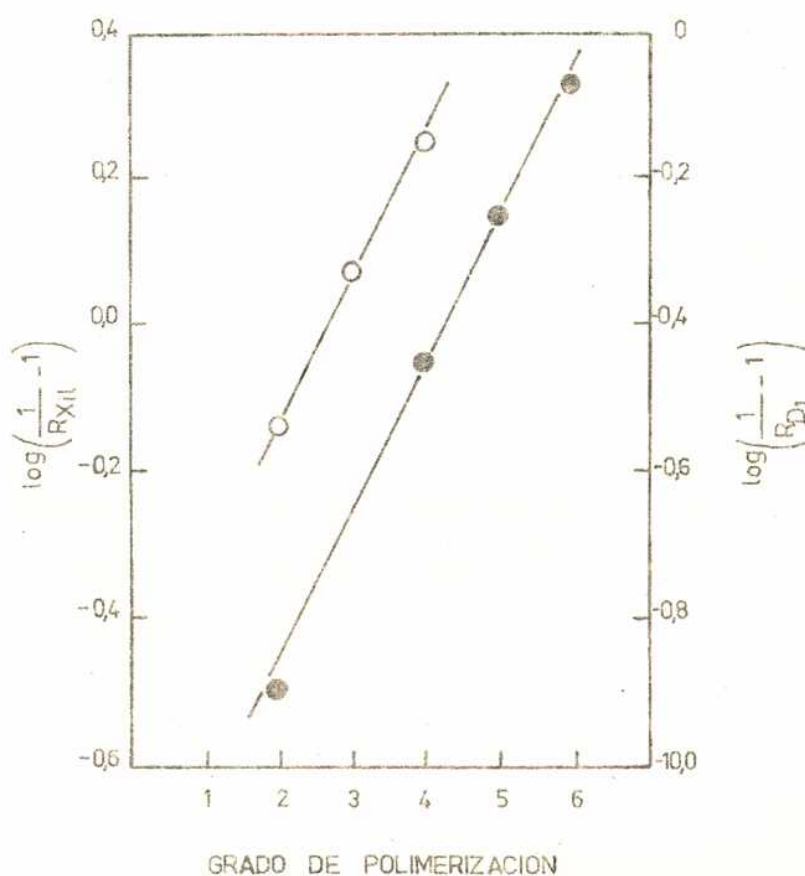


Figura 34. Relación entre la movilidad y el grado de polimerización de los oligosacáridos de la fracción HC. (o) obtenidos por hidrólisis ácida total y (e) por cromatografía preparativa de los mismos. (La asignación del grado de polimerización es arbitraria).

Tabla 46. Relación entre la movilidad y el grado de polimerización de los oligosacáridos de la fracción HC.

Fracción	R _{X11}	$\log(\frac{1}{R_{X11}} - 1)$	R _{D1} ^a	$\log(\frac{1}{R_{D1}} - 1)$
1	0,58	-0,14		
2	0,46	0,07		
3	0,36	0,25		
D1			1	-
D2			0,89	-0,90
D3			0,74	-0,45
D4			0,64	-0,25
D5			0,54	-0,07
D6			ND ^b	-

^a Movilidad decreciente, respecto de D₁.
^b Constituye el total de los productos de hidrólisis que quedan (mancha alargada) próximos al origen.

HIDROLISIS ENZIMATICA

I) Tripsina

La hidrólisis de HC con tripsina produjo, con bajo rendimiento (19,7 %, respecto de la parte de hidratos de carbono), un material (fracción HC_t) que todavía contenía 13,8 % de proteína, es decir el 19,9 % del material nitrogenado original.

Dado que este tratamiento implica una diálisis prolongada durante la hidrólisis (5 días), el uso de solución de ácido tricloroacético al 40 % para precipitar la enzima y otra diálisis posterior para eliminar el tricloroacético, se pensó que estas operaciones podrían producir la pérdida de material no hidrolizado por la enzima, disminuyendo en esta forma los rendimientos.

Se conocía (ver Apéndice, pág. 212) que HC contiene moléculas que pasan a través de la membrana de diálisis y cuando se llevó a cabo un experimento control, se observó que de una solución de HC tratada con ácido tricloroacético, en las condiciones de la hidrólisis enzimática, se recuperaba un 24 % del material original que contenía 44,4 % de proteínas, es decir el 63,8 % del material nitrogenado original.

II) Pronasa

Se realizó la hidrólisis durante 24 horas y el sobrenadante se dializó (7 horas) y liofilizó. Se obtuvo un 57,2 % de material (fracción HC_p) que contenía 56,3 % de proteína, es decir el 81,1 % del contenido proteico original.

La fracción HC_p se cromatografió sobre Sephadex G-25 usando agua como eluyente sin que produjera fraccionamiento. Una nueva cromatografía sobre Sephadex G-100 dio el diagrama de elución indicado en la

Figura 35, en el cual pueden apreciarse dos picos (fracciones HC_{p2} y HC_{p4}) netamente definidos y determinados por máximos coincidentes en el análisis de hidratos de carbono y proteínas. Asimismo aparece una fracción intermedia (HC_{p3}) aparentemente rica en hidratos de carbono.

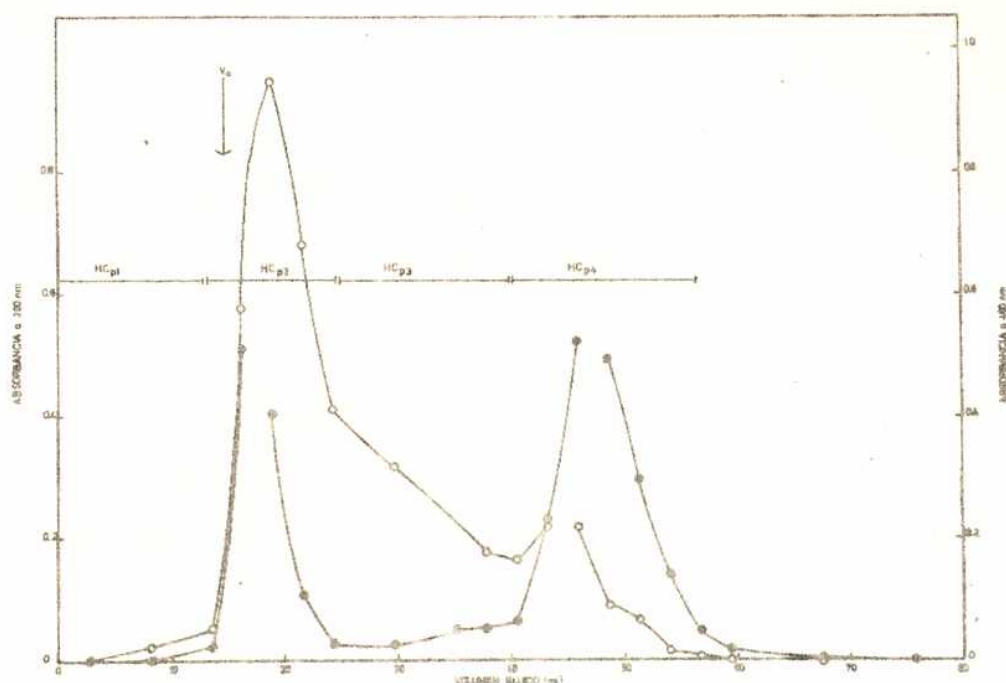


Figura 35. Cromatografía analítica sobre Sephadex G-100 de la fracción HC_p . La columna (30 x 1,8 cm) se eluyó con agua y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm (e) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 nm (o) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V_0 : volumen de exclusión. En éste y los subsiguientes diagramas de elución, las escalas utilizadas para las absorbancias no representan valores cuantitativos (ver Parte Experimental, pág. 162).

La Tabla 47 muestra los porcentajes de recuperación de cada una de las fracciones separadas y la Tabla 48, la composición cuantitativa en monosacáridos de los picos comparada con la de HC original.

Tabla 47. Subfraccionamiento de HC_p .

Fracción	Recuperación (%)
HC_{p1}	3,0
HC_{p2}	15,4
HC_{p3}	5,0
HC_{p4}	79,2
Total	105,8

Tabla 48. Composición en monosacáridos de las fracciones obtenidas por fraccionamiento y desproteinización de HC (moles %).

Monosacárido	HC	HC_1	HC_{p2}	HC_{3-1}	HC_{3-2a}	HC_{3-2c}	HC_{3-2d}	HC_{p4}
Arabinosa	28,3	59,8	57,7	4,3	8,0	93,1	16,5	16,3
Fucosa	5,9	10,6	2,7	Tr	7,3	0	8,4	8,0
Xilosa	15,3	6,4	13,0	2,9	10,6	3,1	17,8	16,5
Manosa	19,0	3,9	2,5	62,6	37,7	2,2	11,2	8,8
Galactosa	10,0	3,4	Tr	23,5	11,6	0	0	5,1
Glucosa	1,3	3,1	18,5	0	1,8	0	11,4	11,0
Ácido galacturónico	4,5	9,1	0	2,8 ^a	12,6	0	0	0
Ácido glucurónico	2,7	0	0	0	0	0	8,2	6,0
Glucosamina	13,0	3,8	4,7	4,3	10,4	1,3	26,5	28,3

^a El ácido hexurónico se determinó por el método del carbazol (Galambos, 1967).

DETERMINACIONES DE HOMOGENEIDAD.I) Ultracentrifugación.

Las corridas efectuadas con HC al 1 % en cloruro de sodio 0,1 M no mostraron la formación de picos. Las corridas se repitieron con soluciones de fuerza iónica 0,1 a pH 2,5 y 10,5 y con soluciones de dodecil sulfato de sodio 0,1 M y 0,5 M en cloruro de sodio 0,1 M, a los efectos de determinar si tal comportamiento podía ser atribuido a la agregación molecular durante la ultracentrifugación. Los resultados fueron idénticos y por lo tanto se dedujo que los productos que componen HC son de bajo peso molecular.

II) Electroforesis sobre gel de poliacrilamida

La electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 7,0 % en solución buffer pH 8,5 dio una sola banda ancha (Figura 36) que reveló con reactivo para proteínas pero no con el de hidratos de carbono (reactivo para glicoproteínas de Uriel y Grabar (1956)).

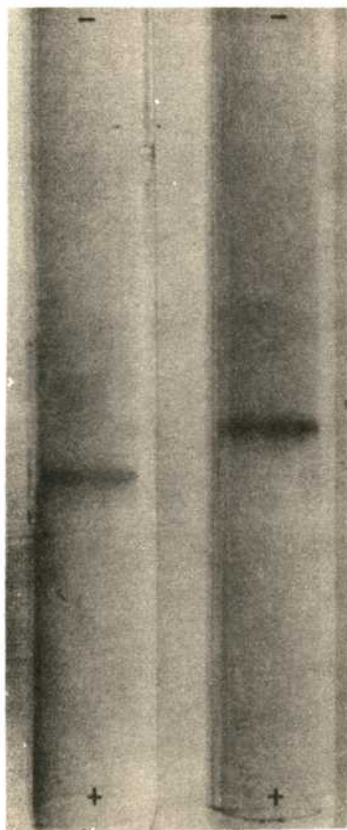


Figura 36. Electroforesis sobre gel de poliacrilamida de la fracción HC.

FRACCIONAMIENTO DE HC. PROPIEDADES DE LAS FRACCIONES.

La fracción se cromatografió sobre Sephadex G-200, obteniéndose el diagrama de elución que muestra la Figura 37. Si bien se observó un cierto fraccionamiento, éste no resultó totalmente satisfactorio por lo que la cromatografía se repitió sobre Sephadex G-100; en este caso se obtuvo el diagrama de la Figura 38. En el mismo puede observarse la aparición de dos picos (fracciones HC₁ y HC₃) bien definidos y formados por los máximos coincidentes en las determinaciones de hidratos de car-

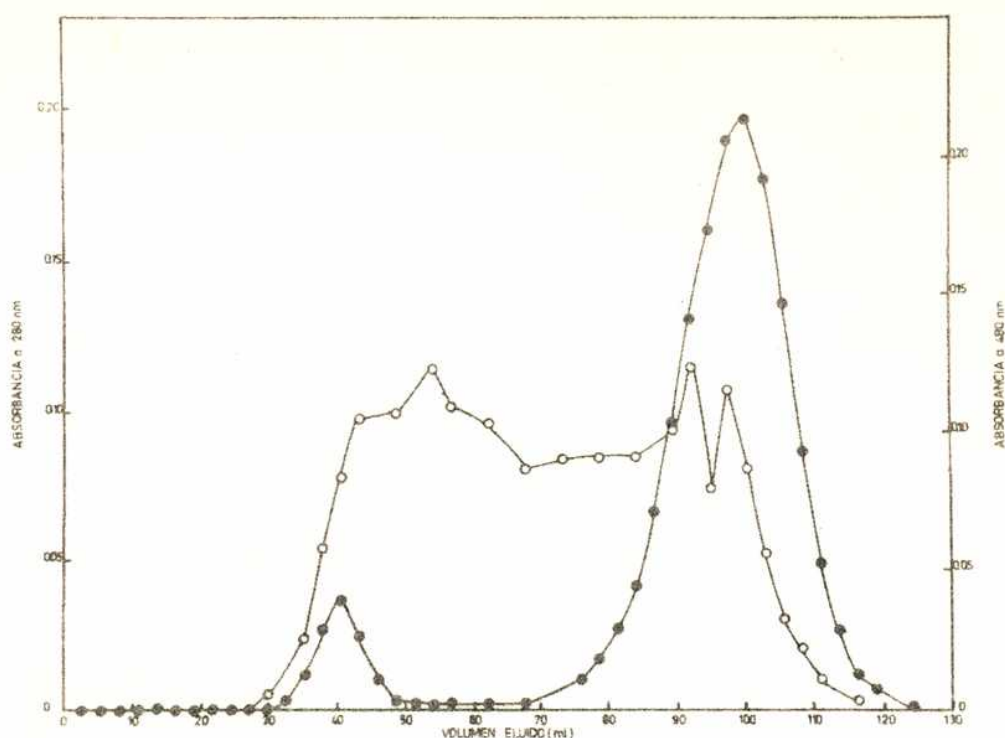


Figura 37. Cromatografía analítica sobre Sephadex G-200 de la fracción HC. La columna (50 x 1,9 cm) se eluyó con agua y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm (●) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 nm (○) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico.

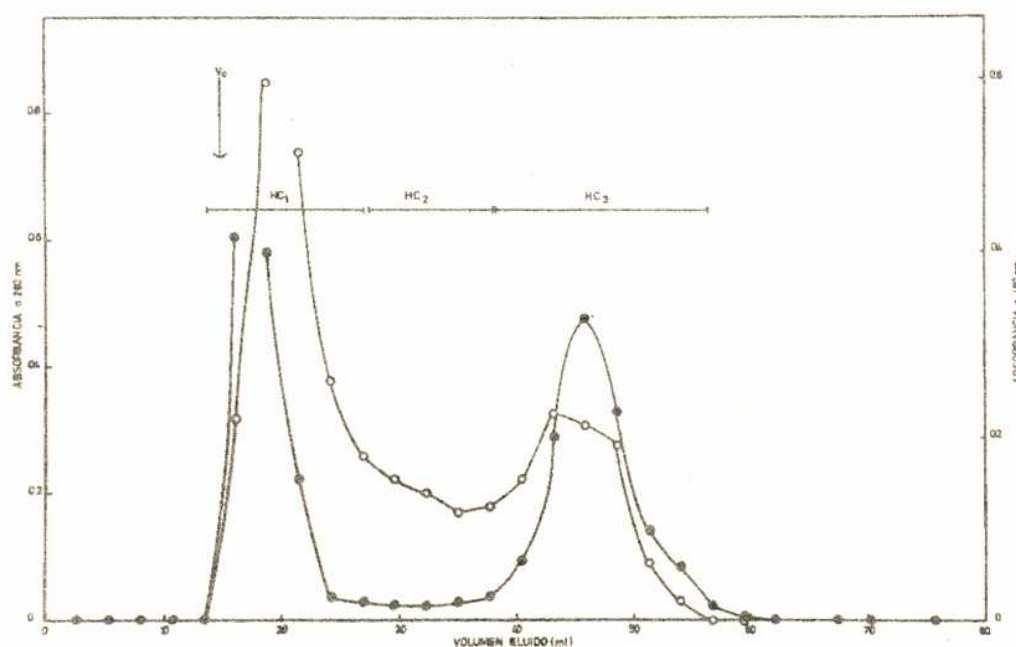


Figura 38. Cromatografía analítica sobre Sephadex G-100 de la fracción HC. La columna (30 x 1,8 cm) se eluyó con agua y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm (●) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 nm (○) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V_0 : volumen de exclusión.

bono y proteínas. Asimismo aparece una fracción intermedia (HC_2) aparentemente formada por hidratos de carbono. Es interesante destacar la analogía existente entre este diagrama y el obtenido por fraccionamiento, en idénticas condiciones, del producto resultante de la hidrólisis con pronasa (Figura 35).

Demostrada la existencia de, por lo menos, dos subfracciones en HC, se pensó en la posible heterogeneidad de las mismas en base a la ya

demostrada tendencia a la asociación que presentan estos productos. Para disminuir la posibilidad de asociación, HC se disolvió en solución de cloruro de sodio 0,05 M y se pasó por la misma columna de Sephadex G-100, eluyendo con dicha solución. El diagrama de elución (Figura 39) resultó esencialmente análogo al obtenido al usar agua como eluyente.

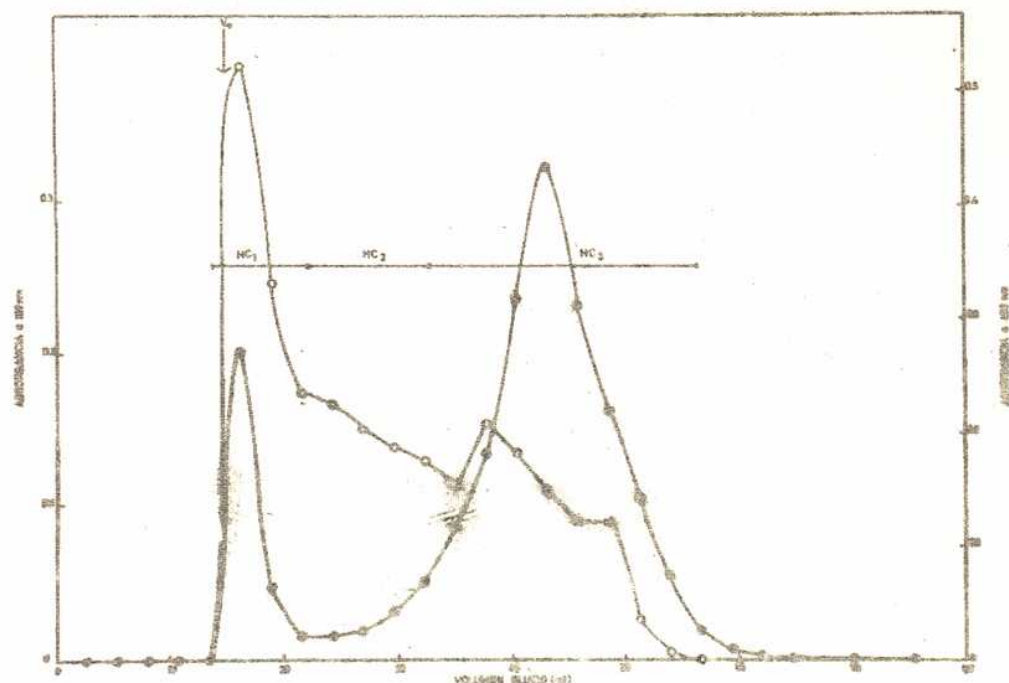


Figura 39. Cromatografía analítica sobre Sephadex G-100 de la fracción HC (extracción N° 1). La columna (30 x 1,8 cm) se eluyó con ClNa 0,05 M y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 mμ (a) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 mμ (o) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V_0 : volumen de elución.

Finalmente se aprovechó el sistema anterior para controlar una fracción HC proveniente de una primera extracción sobre otra muestra de semillas y se obtuvo (Figura 40) un diagrama de elución similar a los anteriores.

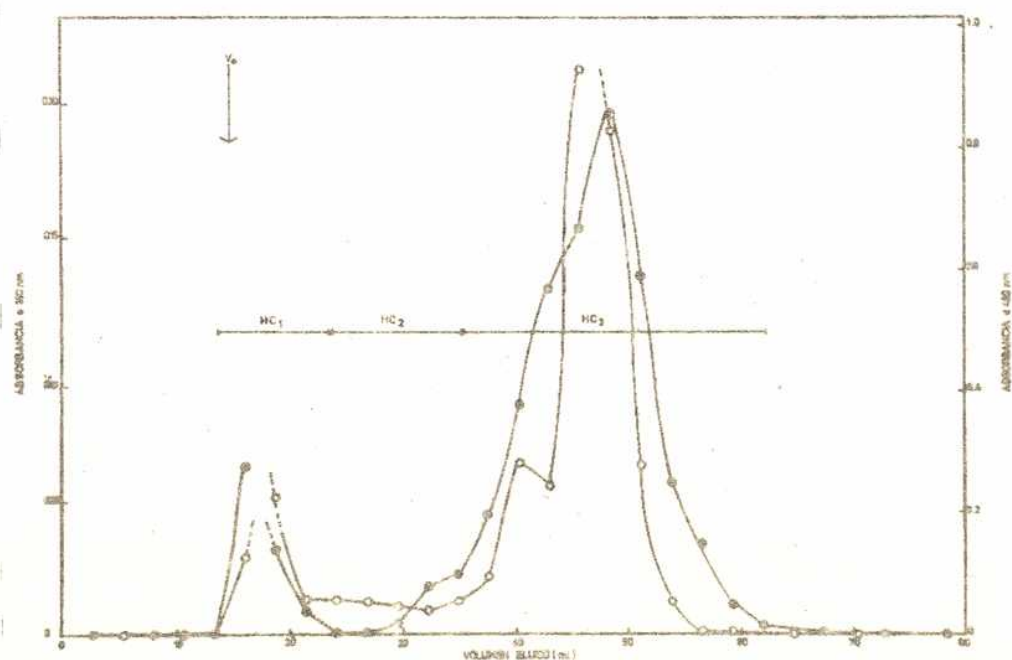


Figura 40. Cromatografía analítica sobre Sephadex G-100 de la fracción HC (extracción N° 2). La columna (30 x 1,8 cm) se eluyó con ClNa 0,05 M y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 mμ (a) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 mμ (o) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V_0 : volumen de elución.

En base a estos resultados se llevaron a cabo fraccionamientos en escala preparativa sobre Sephadex G-100 y eluyendo con solución de cloruro de sodio 0,05 M (Figura 41). En algunos casos se separaron las

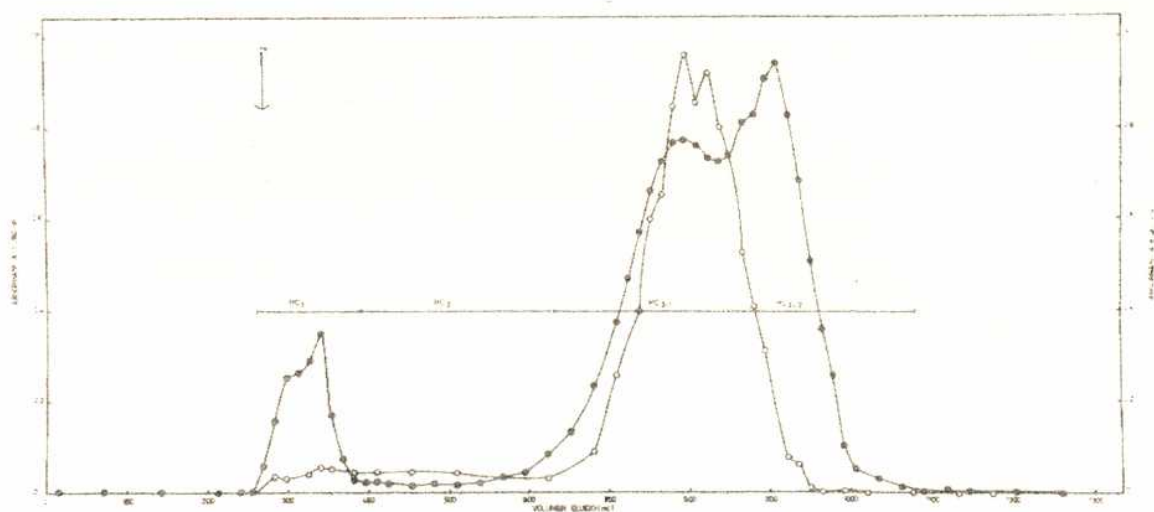


Figura 41. Cromatografía preparativa sobre Sephadex G-100 de la fracción HC. La columna (75 x 4,5 cm) se eluyó con ClNa 0,05 M y se recogieron fracciones de 14 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm (e) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 nm (o) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V_0 : volumen de exclusión. En éste y los siguientes diagramas de elución, los valores de absorbancia no fueron corregidos por dilución (ver Parte Experimental, pág. 162).

tres fracciones: HC₁ (rendimiento 8 a 21 %), HC₂ (rendimiento 5 a 11 %) y HC₃ (rendimiento 59 a 72 %), y para los estudios posteriores se utilizaron HC₁ y HC₃ por corresponder a los picos del diagrama de elución. Dado que las determinaciones de homogeneidad de HC₃ por electroforesis sobre acetato de celulosa y gel de poliacrilamida (Figura 42) y la asimetría de los picos correspondientes a la determinación de hidratos de

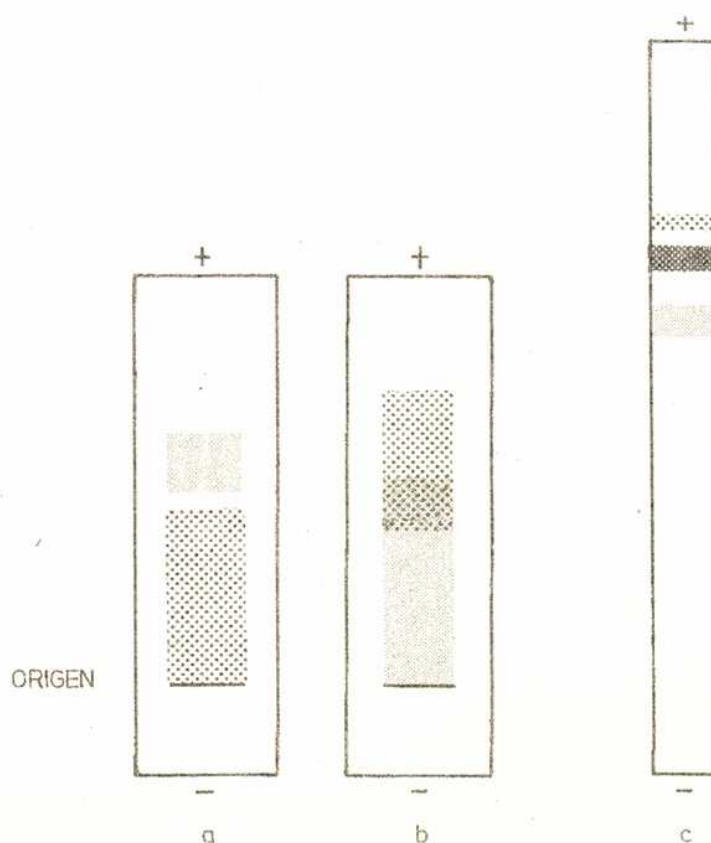


Figura 42. Dibujo de las corridas obtenidas para la fracción HC₃ sobre acetato de celulosa: (a) pH 7, 1,5 mV durante 40 minutos y (b) pH 8,5, 3 mV durante 60 minutos; y sobre gel de poliacrilamida (c) pH 8,3, 4 mV durante 60 minutos.

carbón y proteínas (Figuras 40 y 41), dieron información sobre la heterogeneidad de la misma, se aprovechó el desdoblamiento parcial del pico en la cromatografía preparativa (Figura 41) para obtener directamente las fracciones HC₃₋₁ y HC₃₋₂.

La fracción HC₁ se purificó recromatografiándola sobre Sephadex G-100 (Figura 43) y posteriormente sobre Sephadex G-15 (Figura 44). En este último caso al efectuarse la elución con agua se obtuvo el produc-

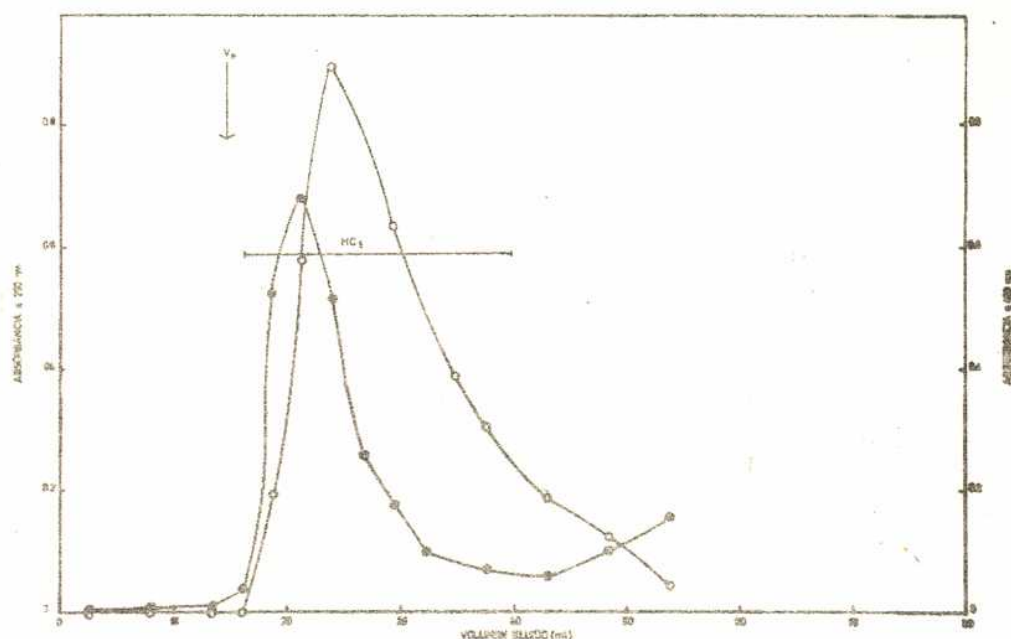


Figura 43. Cromatografía sobre Sephadex G-100 de la fracción HC₁. La columna (30 x 1,8 cm) se eluyó con ClNa 0,05 M y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 mμ (e) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 490 mμ (o) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V₀: volumen de exclusión.

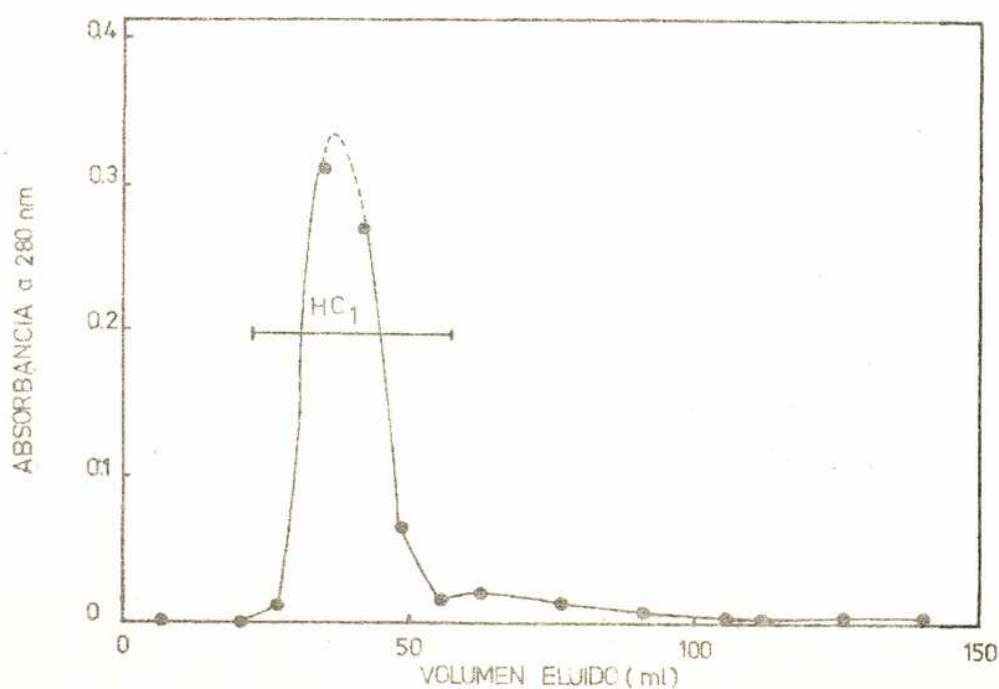


Figura 44. Cromatografía sobre Sephadex G-15 de la fracción HC₁. La columna (50 x 1,9 cm) se eluyó con agua y se recogieron fracciones de 7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 mμ (e).

to libre de sales. La fracción se obtuvo con un rendimiento del 2,5 a 4 % (1) (nitrógeno 3,3 %; azúcares totales 63,6 % expresados como arabinosa, 70,0 % expresados como glucosa y 65,6 % expresados como fracción HB₃; proteínas 20,3 % (2)). La homogeneidad se controló por ultracentrifugación a concentraciones del 0,4 % y 0,8 % (Figura 45) y en ambos casos se obtuvo un único pico simétrico ($S_{20, \omega}$ de $1,52 \times 10^{-13}$ y $1,44 \times 10^{-13}$, respectivamente). La electroforesis sobre acetato de celulosa a pH 2,0 y 8,5 (Figura 46, a y b) mostró una banda gruesa que no se separa del origen y una zona difusa extendida a partir de ella (3 a 4 cm, 50 a 70 % de la corrida). La electroforesis sobre gel de poliacrilamida 7 % dio una única banda fina (Figura 46, c). La composición en monosacáridos está indicada en la Tabla 48.

La fracción HC₃₋₁ se recromatografió sobre Sephadex G-100, eluyendo con cloruro de sodio 0,05 M, y se obtuvo el diagrama de elución que muestra la Figura 47. Se descartó el pico más pequeño (posible remanente de HC₁) y el pico principal se recromatografió dos veces sobre Se

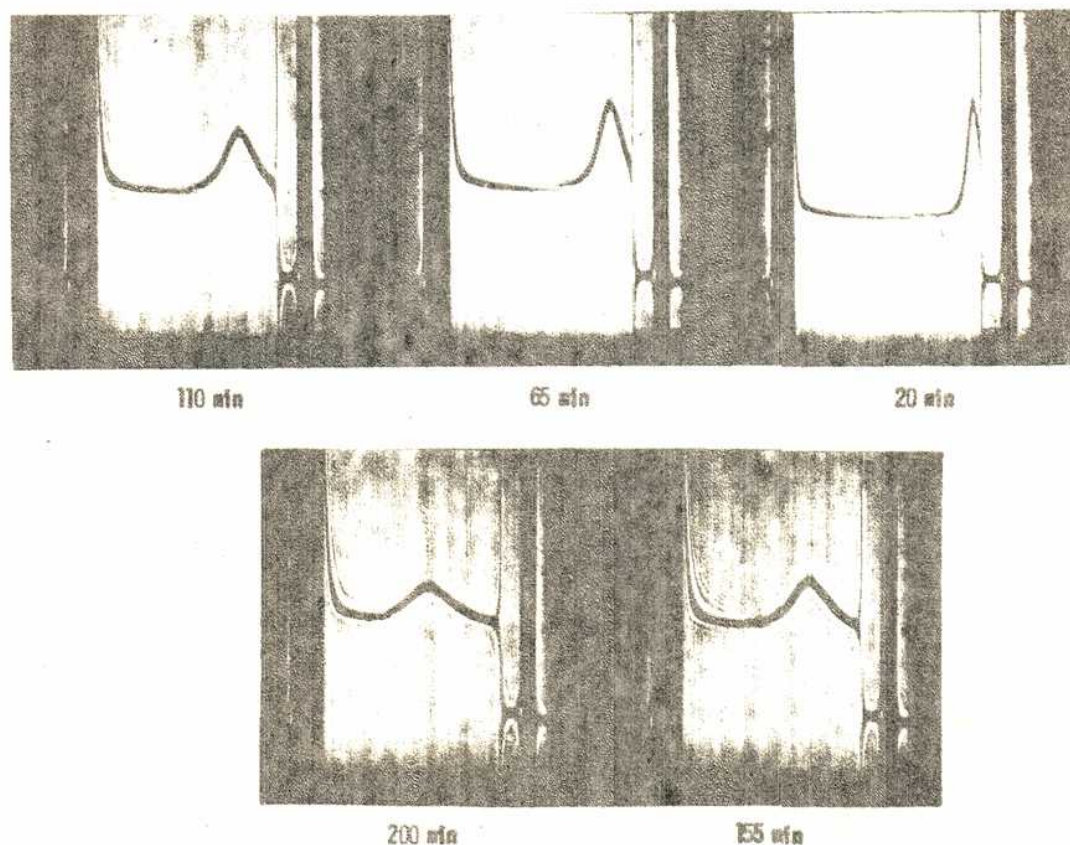


Figura 45. Ultracentrifugación de la fracción HC₁. Las placas se obtuvieron con una solución 0,8 % en cloruro de sodio 0,1 M a 59.780 r.p.m. y las fotos fueron tomadas a los 20, 65, 110, 155 y 200 minutos después de llegar a la velocidad indicada. Las placas obtenidas con una concentración del 0,4 % son similares.

- (1) Las desviaciones observadas en la recuperación total en ésta y las siguientes fracciones, pueden ser atribuidas con facilidad a las pérdidas durante las separaciones y a la reacción de muestra para el análisis de las fracciones eluidas durante las cromatografías.
- (2) Respecto al contenido en proteínas debe hacerse notar que si bien las determinaciones se hicieron por dos métodos distintos (nitrógeno total y absorción a 280 mμ), cuando se realizó la hidrólisis con ClH 6 N para el análisis cuantitativo de los aminoácidos, no se pudo detectar la presencia de los mismos en el hidrolizado. Si la absorción a 280 mμ se adjudica a los núcleos aromáticos constituyentes de la lignina y se efectúan los cálculos correspondientes (ver Parte Experimental, pág. 195), se obtiene un porcentaje de lignina dentro del margen de error del método (1 %), lo que indica que la posible lignina asociada al polisacárido (ver pág. 31) es despreciable.

phadex G-15 (Figura 48). En el último pasaje se eliminó una nueva impureza, y HC₃₋₁ libre de sales, ya que se eluyó con agua, se liofilizó (rendimiento 10,5 %, nitrógeno 7,0 %; azúcares totales 37,1 % expresados como arabinosa, 40,9 % expresados como glucosa y 38,3 % expresados

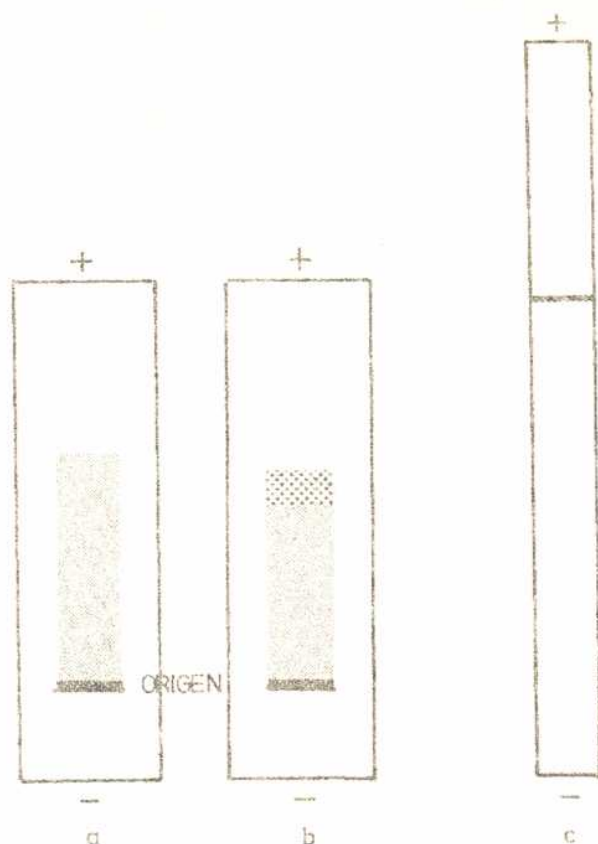


Figura 48. Dibujo de las corrientes obtenidas para la fracción HC₃₋₁ sobre celulosa: (a) pH 2,0, 3 ml durante 60 minutos y (b) pH 4,5, 3 ml durante 25 minutos; y sobre gel de poliacrilamida (c) pH 8,3, 5 ml durante 35 minutos.

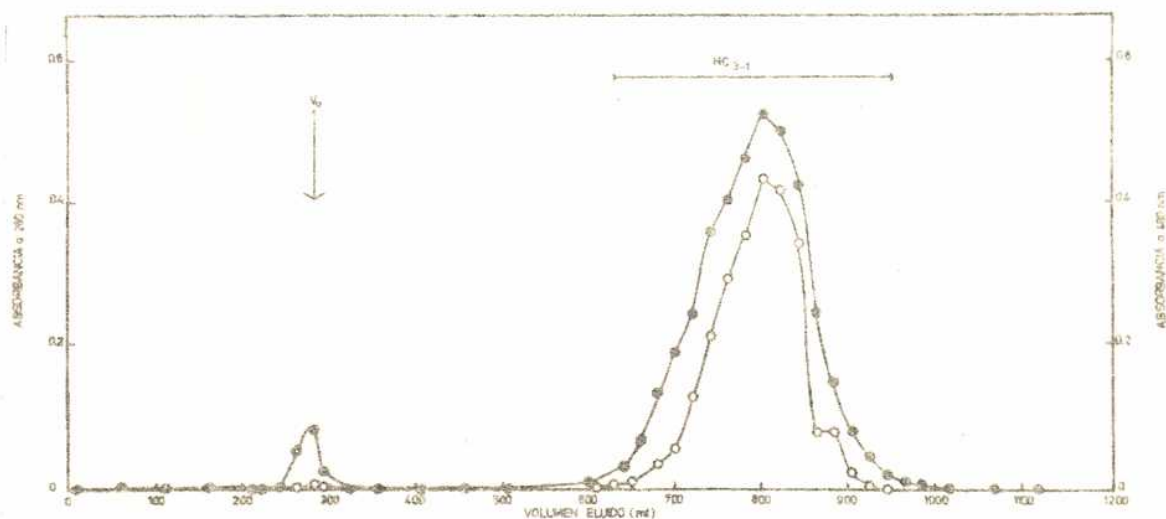


Figura 47. Cromatografía sobre Sephadex G-100 de la fracción HC₃₋₁. La columna (75 x 4,5 cm) se eluyó con ClNa 0,05 M y se recogieron fracciones de 10,1 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm (e) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 460 nm (o) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V₀: volumen de exclusión.

como fracción HB₃; proteínas 42,9 %). La electroforesis sobre gel de poliacrilamida 7 % dio una sola banda relativamente gruesa (Figura 49, a). La composición cuantitativa en monosacáridos está indicada en la Tabla 48 y la de aminoácidos en la Tabla 49.

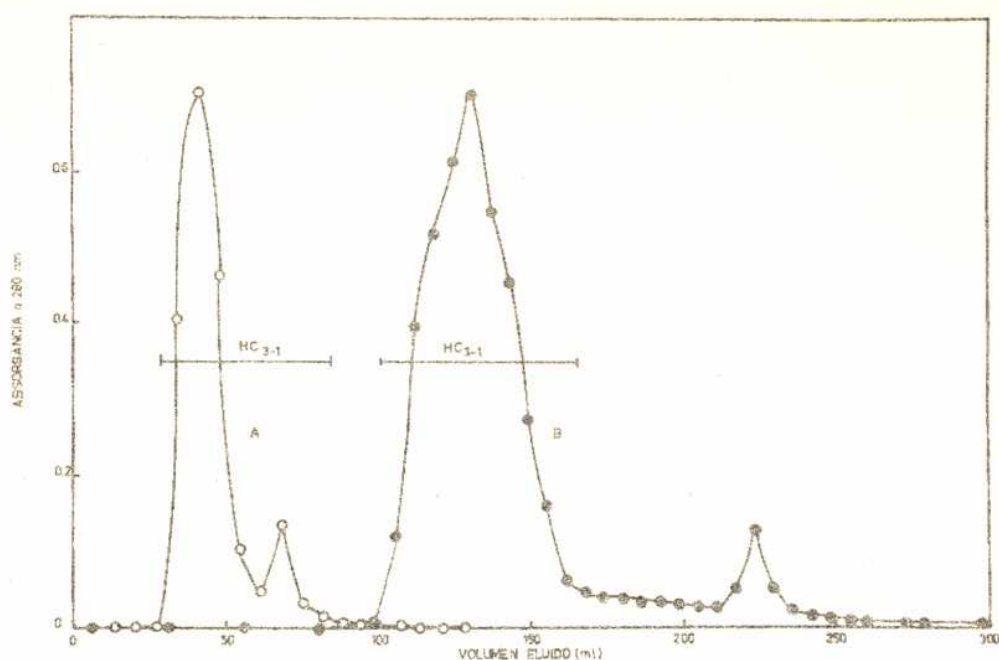


Figura 46. Cromatografía sobre Sephadex G-15 de la fracción HC₃₋₁. Las columnas (A: 50 x 1,9 cm; B: 46 x 3,2 cm) se eluyeron con agua y se recogieron fracciones de 6,9 ml (o) y de 6,2 ml (e) respectivamente. La posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 mμ.

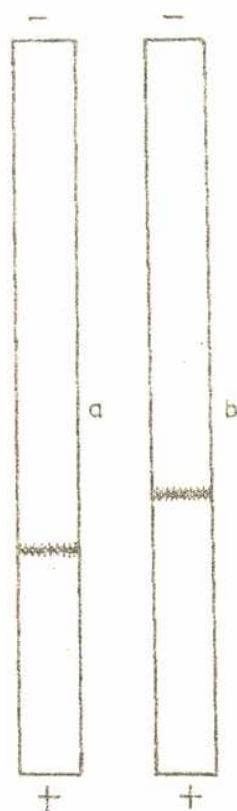


Figura 49. Electroforesis sobre gel de poliacrilamida de la fracción HC₃₋₁ (a) y de la fracción HC₃₋₂ (b) a pH 8,3, 2,5 mlap durante 65 minutos.

La fracción HC₃₋₂ se recromatografió sobre Sephadex G-100, eluyéndose con cloruro de sodio 0,05 M (Figura 50). El eluido correspondiente a la superposición de los picos obtenidos al analizar hidratos de carbono y proteínas, se aisló (fracción HC₃₋₂: azúcares totales

Tabla 49. Composición en aminoácidos de las fracciones obtenidas por fraccionamiento de HC (g/16g N).

Aminoácido	HC	HC3-1	HC3-2a
Acido aspártico	13,3	10,6	10,0
Treonina	1,9	3,8	1,8
Serina	4,6	5,2	1,9
Acido glutámico	21,0	20,3	33,7
Prolina	5,2	9,3	8,7
Glicina	2,5	4,2	1,9
Alanina	5,6	5,6	6,7
Valina	5,5	7,0	6,6
Metionina	2,7	0	0
Isoleucina	4,1	5,6	4,9
Leucina	9,6	9,5	6,2
Tirosina	5,2	3,9	2,2
Fenilalanina	5,4	4,9	2,2
Lisina	4,8	4,9	8,8
Histidina	1,7	0	0
Arginina	7,0	5,4	4,4
Hidroxiprolina	0 ^a	0 ^a	0
Tirosina ^b	3,8	1,6	ND
Triptofano ^b	2,4	1,8	ND
Relación a/b	2,5	3,0	3,3

^a Dentro de los límites del método usado (Leach, 1960), no se detectó hidroxiprolina (0,4 g/100g).

^b G/100g de muestra, determinado por el método de Senczo y Schmid (1957).

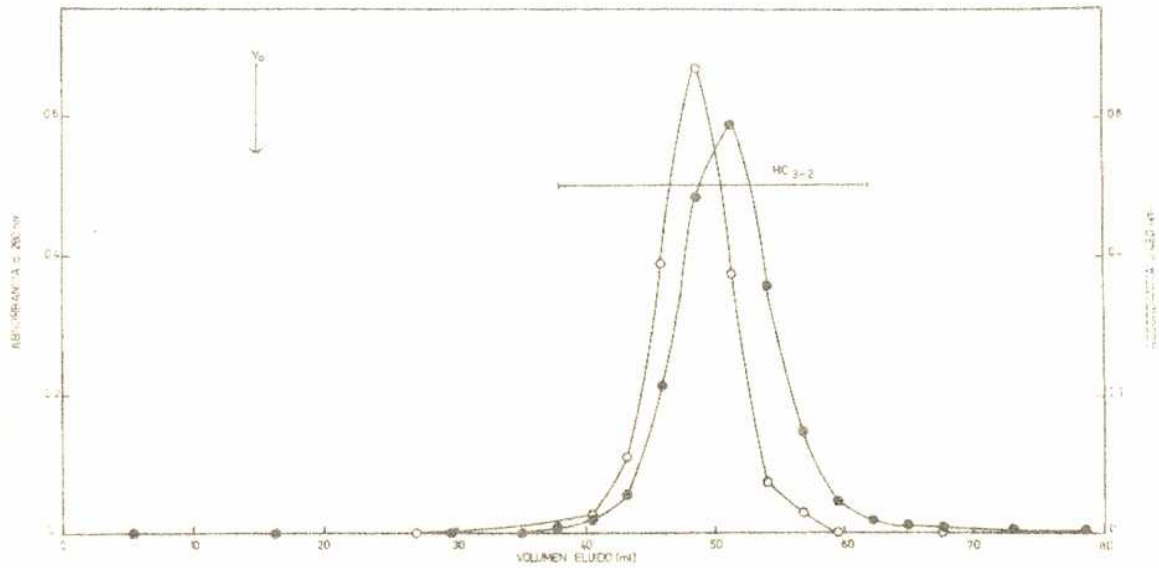


Figura 50. Cromatografía sobre Sephadex G-100 de la fracción HC3-2. La columna (30 x 1,8 cm) se eluyó con ClNa 0,15 M y se recogieron fracciones de 2,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm (●) y la de los hidratos de carbono por la absorbancia a 480 nm (○) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. V₀ : volumen de exclusión.

12,4 % expresados como arabinosa, 13,7 % expresados como glucosa y 12,8% expresados como fracción HB₃; la electroforesis sobre gel de poliacrilamida mostró una única banda usualmente gruesa (Figura 49,b) que reveló

con reactivo de proteínas). Al recromatografiar la fracción aislada sobre Sephadex G-15 y eluyendo con agua (Figura 51) se observaron tres picos bien diferenciados y se separaron las fracciones denominadas HC₃-2a, HC₃-2b, HC₃-2c y HC₃-2d. La segunda fracción se descartó y posteriormente se trabajaron las tres restantes que correspondían a los picos antes mencionados.

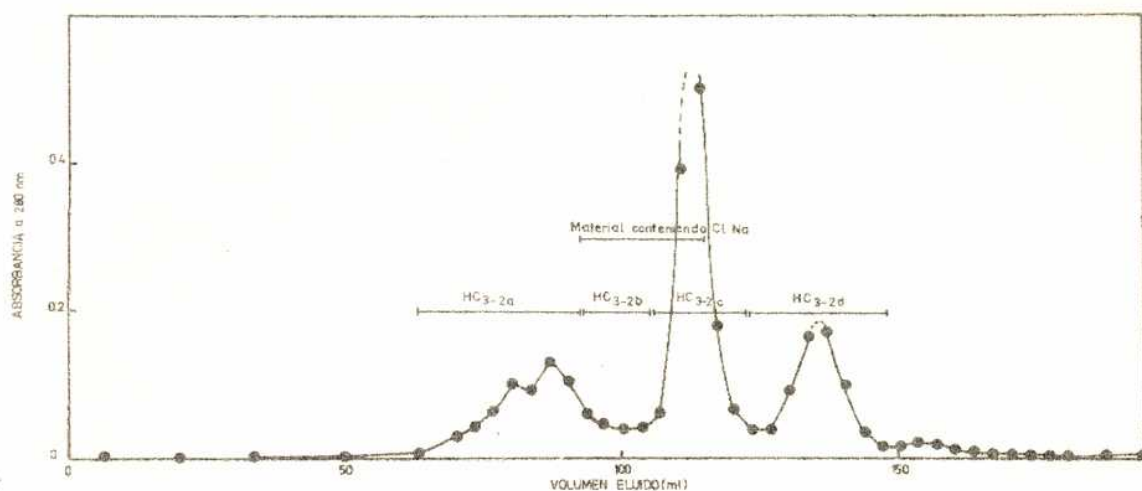


Figura 51. Cromatografía sobre Sephadex G-15 de la fracción HC₃-2. La columna (38 x 3,2 cm) se eluyó con agua y se recogieron fracciones de 6,7 ml; la posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm.

La fracción HC₃-2a resultó prácticamente libre de sales (rendimiento 12,4 %, nitrógeno 6,5 %, proteínas 38,9 %, cenizas 5,9 %). La composición cuantitativa en monosacáridos está indicada en la Tabla 48 y la de aminoácidos en la Tabla 49.

La fracción HC₃-2c retuvo tenazmente el cloruro de sodio que no pudo ser eliminado por dos pasajes sucesivos sobre Sephadex G-15, eluyendo con agua y con etanol 10 % respectivamente (Figura 52). Finalmen-

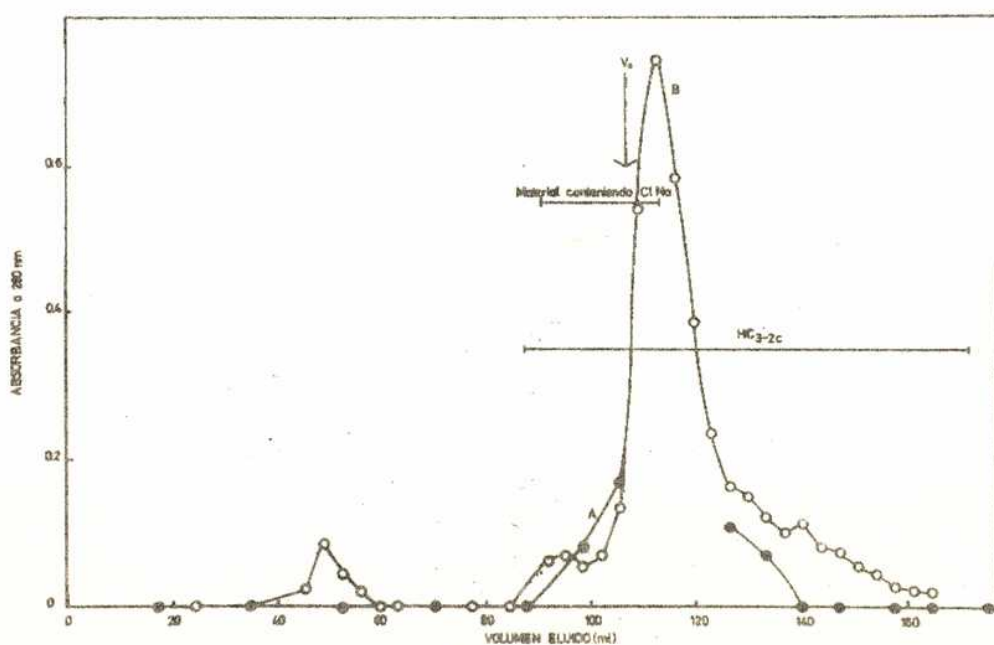


Figura 52. Cromatografía sobre Sephadex G-15 de la fracción HC₃-2c. Las columnas (A: 38 x 3,2 cm; B: 34 x 3,2 cm) se eluyeron con agua (o) y con etanol 10 % (Δ), recogiendo fracciones de 6,7 y 6,9 ml respectivamente. La posición de las proteínas se determinó por la absorbancia a 280 nm.

te, el producto se extrajo con dimetilsulfóxido y la solución sobrenadante, previamente liofilizada, se extrajo nuevamente con etanol absoluto. Se obtuvo un producto, que todavía contenía 7,2 % de cenizas, con un rendimiento del 5,0 %. La composición cuantitativa en monosacáridos del mismo figura en la Tabla 48.

La fracción HC_3-2a resultó libre de sales (rendimiento 0,7 %); la composición en monosacáridos está indicada en la Tabla 48.

La Figura 53 muestra un resumen del fraccionamiento efectuado sobre HC.

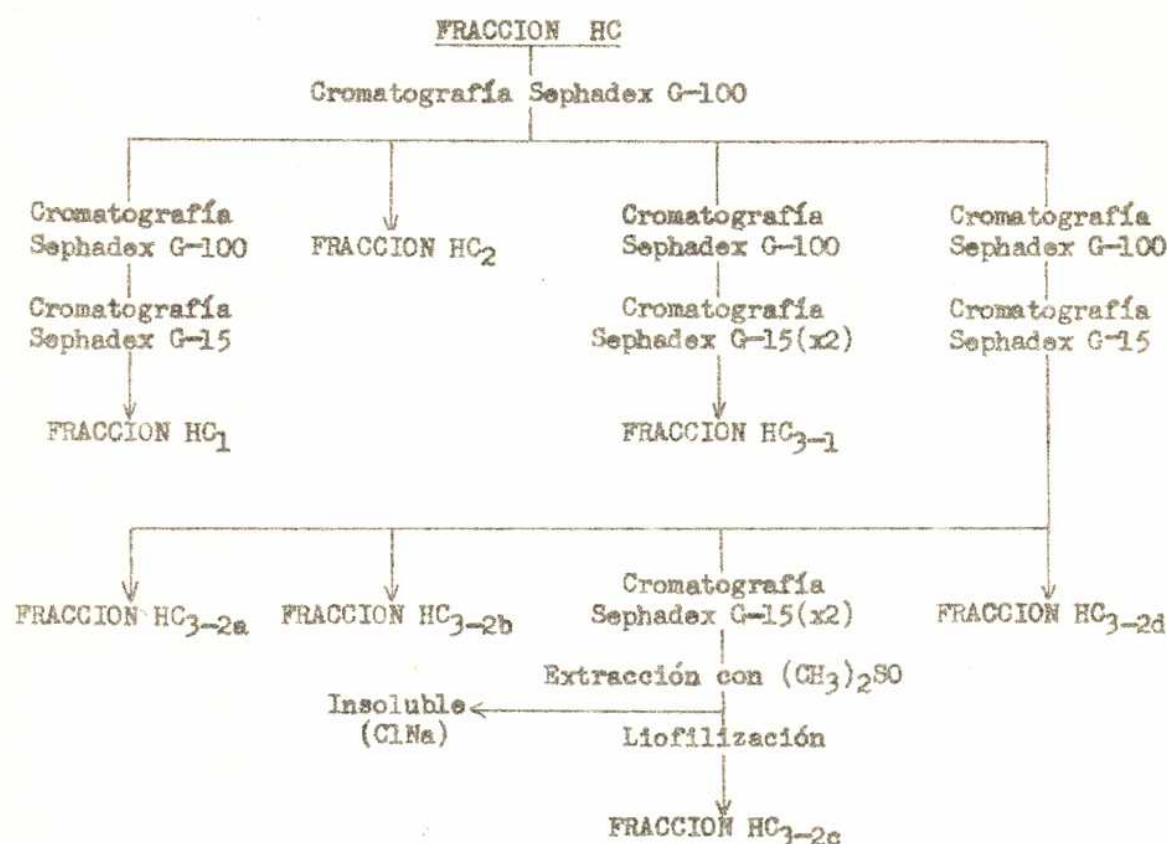


Figura 53. Fraccionamiento de HC.

UNION POLISACARIDO-PROTEINA. DETERMINACION DE LAS UNIONES O-GLICOSIDICAS A SERINA Y/O TREONINA.

El tratamiento con álcali de las glicoproteínas que contienen enlaces O-glicosídicos entre el hidroxilo hemiacetalico del azúcar y el grupo alcohólico de la serina o treonina, o ambas, conduce a la formación, a través de una reacción de β -eliminación (ver Naturaleza del enlace hidrato de carbono-proteína, pág. 27, Figura 5), de las unidades 2-aminoacrílicas y 2-aminocrotónicas respectivamente. Los péptidos que contienen estos grupos absorben en la región ultravioleta, el primero a una longitud de onda máxima de 240 nm y el último con una más generalizada absorción (Figura 54, C). Como la absorptividad molar es la misma (4.200) para ambos compuestos (Price y Greenstein, 1948), es posible medir su formación, y la consiguiente destrucción del enlace polisacárido-

proteína, por el aumento de la absorción a 240 nm.

La absorbancia, a esta longitud de onda, de una solución de HC en hidróxido de sodio 0,1 N a 5 C, se mantuvo constante durante 332 horas (Figura 54, A).

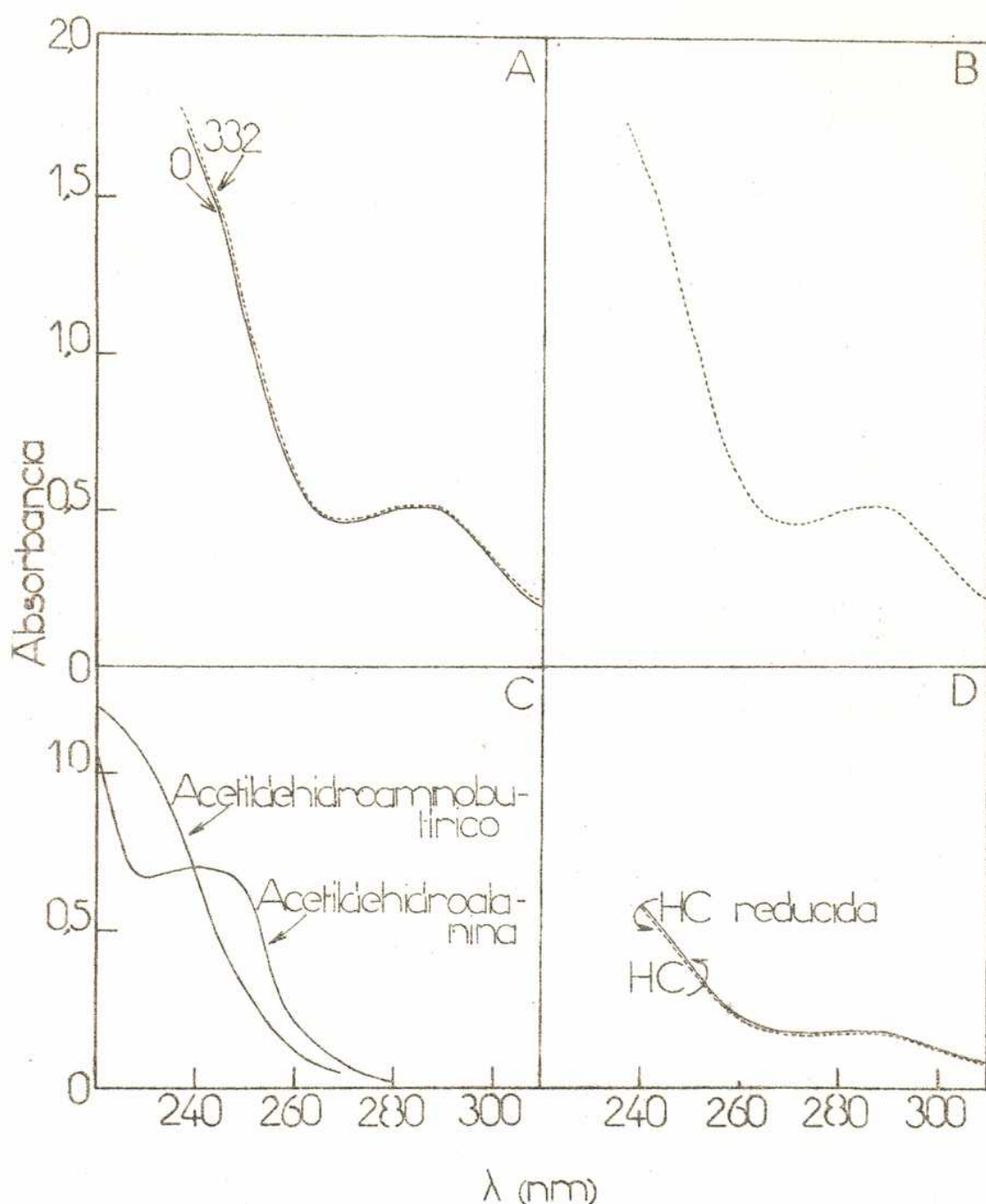


Figura 54. Determinación de los uniones O-glicosídicas a serina y/o treonina en la fracción HC. A, solución 0,05 % en HClO₄ 0,1 N (los números indican el tiempo de tratamiento); B, reducida con borohidruro de sodio; C, curvas de los testigos ($c = 1,7 \times 10^{-4}$ M) obtenidas de Priests y Grossstein (1948); D, reducida con borohidruro de sodio y cloruro de paladio.

A fin de determinar si dicha unión polisacárido-proteína había existido en el material de partida (semilla) y fue destruida durante la extracción alcalina, HC previamente tratada en solución alcalina durante 70 1/2 horas sin que la absorbancia a 240 nm se modificara, fue reducida con borohidruro de sodio siguiendo la técnica de Tanaka y col. (1964). Tampoco en este caso se observó variación de la absorción (Figura 54, B).

Dado que HC contiene aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofa

no y fenilalanina) que absorben en la zona de medición, paralelamente se efectuó el control de una mezcla equimolar de los mismos. Esta mezcla fue sometida a los procedimientos antes descritos sin que se observaran variaciones en su espectro.

Finalmente, como el uso del borohidruro de sodio para reducir las dobles ligaduras formadas es efectivo para convertir el 2-aminoacetoil en alanil derivado, pero sólo reduce parcialmente el 2-aminocrotonil a aminobutiroil derivado, la solución alcalina de HC, proveniente del tratamiento antes indicado, se redujo con cloruro de paladio y borohidruro de sodio a temperatura ambiente durante una hora (Tanaka y Pigman, 1965). Las mediciones no indicaron diferencias en la absorbancia del producto sometido a la reducción y una solución testigo de HC tratada en las mismas condiciones pero sin el agregado de los reactivos reductores (Figura 54, D).

Los resultados obtenidos indicarían que durante la extracción de la fracción HC y aún en el tratamiento alcalino efectuado, no se produce una reacción de eliminación detectable de las posibles uniones glucosídicas a serina y/o treonina, lo que hace poco probable la existencia de tal tipo de unión entre la proteína y el polisacárido.

El estudio morfológico de las semillas indicó que de las tres partes componentes de la misma (Tabla 19), el embrión y el endosperma presentan células con pared primaria únicamente, gruesas en el último caso, y que sólo la testa, que representa hasta un 27 % del peso total de la semilla, posee células con pared secundaria.

El contenido en proteínas de la semilla es del 21 %, y un 76 % del mismo está localizado en el embrión.

POLISACARIDOS SOLUBLES EN AGUA (GALACTOMANANOS).

Fueron obtenidos por extracción de las semillas enteras molidas, sin tratamiento con alcohol o alcohol-benceno para minimizar los efectos propios de esta etapa (ver Extracción de los polisacáridos, pág. 43). Los estudios previos efectuados por Leschziner y Cerezo (1970) indicaron que, por extracción con agua a 50 C, se obtenía un galactomanano homogéneo consistente en una cadena de β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranososa con ramificaciones (una cada 3,2 a 3,5 unidades de D-manosa) de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranososa (ver Polisacáridos de semillas de leguminosas, pág. 12). En nuestro caso se llevó a cabo un estudio más detallado de las fracciones de galactomananos, como parte de una investigación más profunda de los polisacáridos de Gleditsia triacanthos. Para ello la extracción con agua se efectuó en forma secuencial, extrayéndose primero a temperatura ambiente (aprox. 20 a 25 C) en forma exhaustiva y luego, también exhaustivamente, a 50 C. En ambos procedimientos se obtuvieron también galactomananos (denominados G_m y G_{m50} respectivamente⁽⁰⁾) con rendimientos totales (22,4 %) similares a los obtenidos por Leschziner y Cerezo (1970) (15 a 20 %, Tabla 21).

Excepto en los casos de las semillas de Gymnocladus dioica (Larson y Smith, 1955) en las que el galactomanano se extrae de la parte interior de la cubierta, y de las semillas de Glycine max (Aspinall y Whyte, 1964) en las que aparece en las vainas, la fuente de estos polisacáridos es el endosperma. En nuestro caso, la extracción acuosa del endosperma dio por adición gradual de etanol una serie de fraccio-

(0) La nomenclatura usada para las distintas fracciones está indicada en la Tabla 63, y un resumen de los procedimientos de extracción utilizados, en la Figura 20.

nes que precipitaron en un amplio rango de concentraciones (Tabla 24). El análisis de las fracciones obtenidas por extracciones acuosas a 100 C y por extracción alcalina indicaron que el galactomanano no se extrae totalmente a 50 C y como era de esperar (ver más adelante) la relación Man:Gal resultó considerablemente incrementada (3,9 y 4,3 respectivamente); sólo en el producto extraído en medio alcalino se detectaron proteínas (aprox. 5,6 %). A este respecto cabe mencionar que la extracción exhaustiva del galactomanano del endosperma fue realizada por Anderson (1949) (ver pág. 12) con agua caliente varias veces hasta no más precipitación por adición de alcohol, resultando un mucílago soluble que representa el 77 % del peso del endosperma. Por otra parte Aspinall y Whyte (1964), luego de aislar las fracciones de galactomananos solubles a temperatura ambiente y a 50 C de vainas de Glycine max, encontraron por subsiguiente extracción con soluciones alcalinas de borato pequeñas cantidades de un galactomanano con una proporción de galactosa notablemente inferior.

El análisis de los resultados obtenidos con la semilla entera y con el endosperma aislado, permitió obtener las conclusiones que se detallan a continuación.

La Tabla 21 muestra algunas de las características de estos productos. Se puede apreciar que la relación Man:Gal es sólo ligeramente diferente, lo que indicó la existencia en la semilla de un rango estrecho de especies de diferente composición. En este sentido las semillas de Gleditsia triacanthos son más parecidas a las de Gleditsia ferrox y Trifolium repens estudiadas por Courtois y Le Dizet (1963), en las cuales las extracciones con agua a 20 C y 50 C dieron productos con relaciones Man:Gal casi constantes (3,73 a 3,90 y 1,07 a 1,04, respectivamente). En cambio en el caso de las semillas de Ceratonia siliqua y de Cyamopsis tetragonoloba (Hui y Neukom, 1964) y de Glycine max (Aspinall y Whyte, 1964) los galactomananos totales pudieron ser fraccionados por extracción selectiva con agua fría y caliente, obteniéndose fracciones cuyas relaciones Man:Gal indicaron una amplia apertura de composiciones (Tabla 2).

La relación Man:Gal es mayor en G_{m50}, el galactomanano insoluble en agua fría; esto está de acuerdo con estudios anteriores (Dea y Morrison, 1975) donde se ha demostrado que el agua fría remueve eficientemente aquellas especies de mayor contenido en galactosa, mientras que la posterior extracción en caliente permite extraer el polisacárido con menos galactosa. Como el menor contenido en galactosa implica la existencia de menos ramificaciones a lo largo de la cadena de

unidades de D-manosa, la menor solubilidad de estos galactomananos puede explicarse en base a una mayor facilidad de adosamiento de las cadenas entre sí o con otros componentes. Por otra parte, como las relaciones Man:Gal no son muy diferentes para G_m y G_{m50} , la mayor dificultad en la extracción de este último de las células, podría deberse a una inserción irregular de las cadenas laterales de D-galactosa, lo que dejaría zonas de la molécula tipo manano y permitiría el adosamiento. Fenómenos de este tipo han sido observados al estudiar las estructuras terciarias de los complejos galactomananos-carragenanos (Dea y Morrison, 1975).

El análisis de la Tabla 21 revela también que tanto G_m como G_{m50} contienen cantidades apreciables de proteínas asociadas, cuya composición en aminoácidos está dada en la Tabla 22. Para comparar se utilizaron las composiciones promedio de la vicilina y la legumina, dos proteínas puras aisladas de Pisum sativum (Tabla 7). Los resultados mostraron, al igual que para la semilla entera (Tabla 20), una neta preponderancia de los aminoácidos dicarboxílicos (ácidos aspártico y glutámico) que en el caso de G_{m50} llega al 40,7 % del total de los aminoácidos y no baja en los otros del 28 %. El porcentaje de aminoácidos básicos, principalmente lisina y arginina, llega en la proteína asociada a los galactomananos al 12,0 a 13,6 %, siendo menor al de la vicilina y legumina (17,3 % y 18,2 % respectivamente) y notablemente inferior al de la semilla entera (21,4 %). Estas propiedades, junto con un porcentaje relativamente alto de leucina, son características de las proteínas de reserva de las leguminosas. Además se observa un bajo contenido en aminoácidos azufrados, propio de las proteínas vegetales, y la ausencia de hidroxiprolina, lo que confirmaría que se trata de proteínas de reserva y no estructurales (ver Proteínas de semillas de leguminosas, pág. 15).

Por otra parte, si se calcula la relación de los porcentajes de aminoácidos ácidos a aminoácidos básicos (a/b) se encuentra una marcada diferencia entre las proteínas de los galactomananos (aprox. 3,1) y las proteínas de Pisum sativum (aprox. 1,8). La diferencia se hace aún mayor (aprox. 1,3) para la semilla entera (Tabla 20), lo que indica que en la misma existen proteínas de composición diferente con un marcado aumento en el porcentaje de aminoácidos básicos.

Si consideramos a las proteínas de los galactomananos como parte componente de una misma molécula con el polisacárido, estaríamos en presencia de una glicoproteína. A este respecto es interesante desta-

car que los intentos de fraccionamiento de G_m (Tabla 23) dieron fracciones que contienen distintos porcentajes de proteínas. Además el galactomanano de Gleditsia triacanthos estudiado por Leschziner y Cerezo (1970) contenía aproximadamente 1,8 % de proteína que fue retenida a través de todos los procesos de purificación. Sin embargo, los repetidos intentos de purificar el polisacárido por adsorción de la proteína asociada mediante el uso de la cromatografía de intercambio iónico sobre geles, dieron resultados negativos (no adsorción de la proteína) debido posiblemente a: (a) los bajos porcentajes de proteína presente en las fracciones y (b) la viscosidad de las soluciones del galactomanano, aún a mayores diluciones, lo que no permitiría el contacto entre la proteína y los grupos intercambiadores del gel. Por lo tanto no fue posible obtener ninguna conclusión de valor en base a estos resultados.

Otro de los factores que llaman la atención en el análisis de los galactomananos es la presencia de pequeñas cantidades de glucosamina (Tabla 21), hecho que había pasado desapercibido en los estudios anteriores realizados por cromatografía sobre papel y densitometría (Leschziner y Cerezo, 1970), lo cual es muy importante ya que de confirmarse que estos galactomananos son glicoproteínas (ver más adelante), el aminoazúcar sería el punto de unión, a través de un enlace tipo glicosilamina con la asparagina, entre el polisacárido y la proteína.

Dada la tendencia a asociarse que presentan las proteínas de reserva de las leguminosas y el hecho de que se haya determinado en muchas de ellas la presencia de glucosamina (Pusztai, 1964) y de azúcares neutros (Pusztai, 1965a) especialmente manosa (estas características han sido discutidas en Proteínas de semillas de leguminosas, pág. 15, y Glicoproteínas de vegetales superiores, pág. 23), podría pensarse que los productos analizados son asociaciones entre el galactomanano y una glicoproteína del tipo de las mencionadas; aunque llegar a establecer definitivamente este tipo de asociaciones "in vivo" no es posible debido particularmente a que los preparados fueron secados después de la extracción (Knee, 1973). El análisis de los datos indicó que la cantidad de glucosamina dosada es (1,9 a 2,4 g anh. glucosamina/100 g) del orden de las encontradas para las glicoproteínas de Phaseolus vulgaris (Tabla 16).

Por otra parte, cuando G_m fue fraccionado (Tabla 23) una de las fracciones (G_{m30}), que representa el 56,5 % del total, mostró un porcentaje de glucosamina del 8,4 % (p/p), lo que daría un porcentaje de nitrógeno de aminoazúcares (0,7 %) equivalente al del nitrógeno to-

tal dosado (0,4 %, el error en la determinación del nitrógeno total para valores bajos es considerable ($\pm 0,3$ %). Este resultado parecería implicar para esta fracción, la ausencia de proteínas. Además, para el total de las fracciones (Tabla 23) se observó que cuando disminuye el porcentaje de proteínas, aumenta el de glucosamina.

La determinación de la homogeneidad de G_m por precipitación fraccionada mostró que, a diferencia de los datos informados previamente (Leschziner y Cerezo, 1970), el galactomanano precipita en un rango amplio de concentración de etanol (Figura 18). Se obtuvieron de este modo cinco fracciones (Tabla 23) que diferían fundamentalmente en el contenido de proteínas y de glucosamina, pero muy poco en la relación Man:Gal (las fluctuaciones caen dentro del error experimental). Estos resultados indicaron que el rango de variación de la composición de los galactomananos de G_m es estrecho, y que la polidispersidad observada, y por ende la solubilidad, no es atribuible al polisacárido sino a la presencia de la proteína. A este respecto debe recordarse que al intentar redissolver la fracción de mayor contenido proteico (G_{m15}) se obtuvo una parte insoluble rica en proteína (65 %), mientras que la fracción solubilizada contenía un porcentaje de proteínas (15,6 %) equivalente al encontrado en las otras fracciones o en los galactomananos de extracción directa (G_m y G_{m50}). Por otra parte no puede descartarse la posibilidad de que la polidispersidad se deba también a diferencias en el tamaño molecular ya que el peso molecular mínimo, calculado en base a la relación Man+Gal:GluN (Tabla 23), disminuye al aumentar la solubilidad.

Por último, es interesante notar que cuando se repitió el procedimiento de extracción usada por Leschziner y Cerezo (1970), es decir la extracción directa a 50 C, se obtuvo un galactomanano (G_{mt} , Tabla 21) cuyo análisis correspondía a lo esperado en función de los resultados obtenidos con G_m y G_{m50} , y al igual que éstos difirió del trabajado por dichos autores en: (a) el contenido en proteína es cinco a seis veces superior, aún considerando las diferencias atribuibles a los distintos métodos usados, y (b) la relación Man:Gal es menor, aunque los datos no son comparables ya que se emplearon métodos de dosaje con distintos rangos de error y en especial es conocido el error producido por la densitometría utilizada por los referidos autores.

A modo de conclusión puede afirmarse que los galactomananos extraídos sucesivamente a temperatura ambiente y a 50 C a pesar de haber sido obtenidos con los mismos rendimientos, difieren del obtenido por Leschziner y Cerezo (1970) en las relaciones Man:Gal, en la presencia de glucosamina y de la proteína asociada al galactomanano. Las diferencias pueden ser atribuidas fundamentalmente a variaciones en la fragmentación producidas por la extracción, aunque es muy frecuente en este tipo de materiales encontrar también diferencias de origen ecológico.

P O L I S A C A R I D O S I N S O L U B L E S E N A G U A

Los polisacáridos remanentes de agotar el material por extracción acuosa han sido definidos operativamente, y en general se supone que los tipos de estructuras quedan determinados por el procedimiento de extracción; cada reactivo afecta un tipo de entrecruzamiento (uniones covalentes o no covalentes) o produce la degradación y consiguiente solubilización por ruptura de enlaces, oxidación, etc. El tratamiento con álcali extrae las hemicelulosas, polisacáridos constituidos fundamentalmente por xilosa, arabinosa y ácidos glucurónico y 4-O-metilglucurónico, junto con menores cantidades de manosa, galactosa y glucosa. El uso de soluciones de oxalato de amonio, EDTA, etc., proporciona los polisacáridos conocidos bajo la denominación de sustancias pécticas y que están formados por ácido galacturónico, galactosa, arabinosa y ramnosa, y pueden presentar en menor proporción fucosa y xilosa. En casos especiales se han utilizado soluciones de urea para extraer glucanos y xiloglucanos. La falta de definición entre los distintos tipos de polisacáridos ha sido discutida por varios autores (ver Extracción de los polisacáridos, pág. 43) que indicaron la imprecisión de tal clasificación desde el punto de vista molecular, ya que los productos aislados por una metodología pueden presentar las características propias de los otros grupos.

En nuestro caso, con el múltiple propósito de: (1) aislar los productos característicos de cada procedimiento, simplificando la posterior separación de las mezclas, (2) comparar los productos aislados, y (3) establecer las posibles interacciones entre los polímeros, el residuo fue extraído por separado con:

- a) hidróxido de potasio 10 %

b) oxalato de amonio 1 %

c) urea 7 M.

Las extracciones se llevaron a cabo sobre el residuo insoluble en agua a 50 C sin secado previo para minimizar los inconvenientes propios de esta etapa (ver Extracción de los polisacáridos, pág. 43).

En el caso (a), las hemicelulosas se aislaron sin deslignificación previa (los bajos niveles de lignina que caracterizan a este tipo de materiales, hicieron innecesaria la deslignificación (ver Extracción alcalina, pág. 44) y además es conocido el efecto que sobre los aminoácidos de las glicoproteínas produce el tratamiento con clorito de sodio-ácido acético (Selvendran y col., 1975)) y se fraccionaron según el método de O'Dwyer (1926), levemente modificado para aislar directamente las hemicelulosas A, B y C. Los estudios tendientes a una caracterización más detallada de los fragmentos (ver más adelante), se llevaron a cabo sobre estos productos.

Los resultados obtenidos en los tres casos están resumidos en las Tablas 27 y 28. El análisis de las mismas permitió obtener las conclusiones que se detallan a continuación.

Todas las fracciones de hemicelulosas así como las obtenidas en los casos (b) y (c) contienen proteínas asociadas cuyo estudio revela los mismos aminoácidos componentes y en proporciones semejantes, salvo en el caso de HB que muestra un contenido mucho mayor de ácido glutámico.

El análisis de los hidratos de carbono indicó la presencia en todas las fracciones de los mismos ocho monosacáridos: dos pentosas, arabinosa y xilosa; una 6-desoxihexosa, fucosa, tres hexosas, manosa, galactosa y glucosa; un ácido urónico, ácido galacturónico; y un aminoazúcar, glucosamina. El monosacárido más importante en todos los casos es, desde el punto de vista cuantitativo, la arabinosa que puede llegar a constituir hasta un 46 % de los monosacáridos totales (HB), y el menos importante la glucosa, cuyo porcentaje máximo llega al 3 %. De los otros seis monosacáridos intervienen con un porcentaje mayor del 10 %, xilosa en cuatro fracciones, ácido galacturónico y galactosa en dos fracciones, manosa en todas y glucosamina en una fracción. Es de hacer notar la ausencia de ramnosa en las hemicelulosas y en las sustancias pécticas.

En consecuencia todas las fracciones obtenidas en las extracciones contienen los azúcares componentes de las hemicelulosas y las sustancias pécticas, salvo la ramnosa, pero los porcentajes relativos

no son los que se podrían preveer bajo estos conceptos. Por otra parte, aparece un azúcar no usual en estos compuestos: glucosamina. A este respecto, hasta donde llega nuestro conocimiento, la presencia de una hexosamina sólo ha sido detectada (no identificada) en los hidrolizados de glicoproteínas de paredes celulares de frutos de manzano (Knee, 1973).

La solución de urea 7 M, que ha sido utilizada para extraer β -glucanos de las paredes celulares de células de endosperma de semillas de cebada (Costello y Stone, 1968) y de Lolium multiflorum (Smith y Stone, 1973), extrajo un producto de características análogas a los extraídos con álcali (caso (a)) o con oxalato de amonio (caso (b)). Estos resultados indicaron la no existencia de cantidades apreciables de β -glucanos extraíbles en esas condiciones, confirmándose las observaciones de Kooiman (1960 a, b) que no detectó amiloides en las semillas de Gleditsia triacanthos (ver Amiloides, pág. 6), y sugirieron la presencia de un producto complejo, o mezcla de productos, que se obtiene con variaciones cuantitativas bajo distintos métodos de extracción.

En efecto, la existencia de tantos monosacáridos, así como de proteína, parecería indicar que se trata de una mezcla de sustancias ya que no es frecuente encontrar productos puros que contengan más de tres o cuatro azúcares componentes. No se descarta la posibilidad de que se haya producido la agregación entre los distintos polímeros durante la neutralización y/o precipitación, y en especial teniendo en cuenta que los materiales fueron secados después de la extracción (Knee, 1973). Sin embargo, el hecho de que la composición cuali y semi cuantitativa en monosacáridos y aminoácidos es similar en todos los casos, independientemente del procedimiento de extracción, y que los repetidos intentos de fraccionamiento de cada una de las fracciones y las determinaciones de homogeneidad (ver más adelante) no hayan podido separar a dichas "mezclas", indicaría la existencia de algún tipo de unión entre los componentes. La única excepción la constituye la hemicelulosa C la cual, a través de un elaborado proceso de fraccionamiento por cromatografía sobre geles de distintas mallas, pudo ser separada en cinco productos de diferente composición y peso molecular (Tabla 48, ver más adelante) entre los cuales se identificó un fucoarabano y un galactomanano; las otras tres fracciones de la hemicelulosa C contienen monosacáridos que no pueden ser identificados con polisacáridos definidos. Esta mezcla de productos que forman la hemicelulosa C era esperada ya que según se sabe (ver Hemicelulosas, pág. 8) la misma está constituida por los productos de degradación de las hemicelulosas A y B.

En base a los resultados observados se consideró conveniente mantener la denominación de las fracciones (Tabla 63) correspondiente al método de extracción utilizado, aún cuando las experiencias pudieran indicar que sus estructuras no correspondían a las que definen estos polisacáridos.

HEMICELULOSAS

Las hemicelulosas se extrajeron con hidróxido de potasio 10 % del residuo remanente de la extracción exhaustiva con agua a 50 °C de los galactomananos (Figura 20). Se fraccionaron según el método de O'Dwyer (1926) en el cual se define como hemicelulosa A el producto insoluble en agua a pH 4,5-5, como hemicelulosa B el remanente insoluble en etanol 75 %, y como hemicelulosa C, el producto restante.

El método se modificó levemente al no usar ácido acético para neutralizar el extracto alcalino sino que directamente se dializó hasta neutralidad. Si bien la precipitación se realiza así en forma mucho más lenta y gradual y a pH 6 en vez de 4,5-5, se elimina la formación de sales inorgánicas, lo que posibilita el estudio de la hemicelulosa C. Además, si bien el uso de la diálisis determina como factor negativo la pérdida de productos de bajo peso molecular (Knee, 1973), hecho comprobado en nuestras experiencias, la eliminación de las moléculas degradadas permitió el estudio de las fracciones de mayor peso molecular, a partir de las cuales, por degradaciones químicas o metabólicas (Blake y Richards, 1970) se originan las fracciones dializables. En consecuencia los resultados descriptos corresponden a lo que se definió como "hemicelulosas no dializables". A este respecto cabe mencionar que, durante la realización del presente trabajo, Blake y col. (1971) publicaron una nueva técnica que aprovecha las ventajas de la diálisis sin su inconveniente mediante la neutralización de las aguas de diálisis con resinas de intercambio y el reciclado en sistema cerrado hasta neutralidad total.

El examen de los rendimientos totales obtenidos en tres extracciones sucesivas y los respectivos rendimientos de las hemicelulosas A, B y C (Tabla 25, procedimiento 1) indicó que los resultados no son reproducibles. De igual forma, los dosajes de nitrógeno en fracciones equivalentes obtenidas en las distintas extracciones (Tabla 26, procedimiento 1), dieron datos diferentes.

La falta de reproducibilidad en los rendimientos de HA y HB (la HC no ha sido en general estudiada debido a la acumulación de sales) fue notada por Gaillard (1965), quien comentó el hecho de que la separación de las HA y HB no era neta ya que cuando esta última se redisolvió en álcali y se neutralizaba, se obtenía un precipitado que por definición es HA. Este hecho fue observado en todos nuestros intentos de fraccionamiento de HB. Usualmente estos insolubles son descartados, pero en nuestro caso se procedió al análisis de uno de ellos (HB₁, Tabla 42) y se encontró que la composición cuantitativa en monosacáridos difería marcadamente de la de HB. Cuando se intentó redissolver nuestra HB en agua a pH 5, se obtuvo un insoluble del 6 %. La hidrólisis del mismo y la cromatografía en papel indicaron la existencia de mayor cantidad de arabinosa y la falta de hexosas, lo que difiere de los resultados obtenidos con las fracciones de HB solubles a ese pH (Tabla 40) y las fracciones componentes de HA (Tablas 33 y 34), ya que todas ellas presentan cantidades apreciables de hexosas.

Comprobaciones similares fueron efectuadas por Blake y col. (1971) al hallar una marcada diferencia en los rendimientos de las hemicelulosas A y B obtenidas por el método de diálisis y el convencional (O'Dwyer, 1926). Las muestras de pastos que analizaron (Heteropogon contortus) daban muy poca HA por el método convencional y cantidades considerables por el método de diálisis, con la correspondiente disminución en el rendimiento de HB. Estas diferencias no son constantes y dependen del producto extraído, no observándose por ejemplo en la hemicelulosa de caña de azúcar. Estos autores supusieron que la falta de reproducibilidad en el fraccionamiento estaba asociada con una variación en la extensión de la dispersión y/o solubilización de las moléculas debido a la fuerza iónica, el tiempo de neutralización, las pequeñas variaciones (polidispersidad) en la estructura principal, etc., y a fin de "homogeneizar" los sistemas propusieron un calentamiento de 10 minutos en baño de agua a ebullición y un período de estabilización posterior de 5 horas a 30 C, antes de proceder al fraccionamiento en HA y HB. En la Tabla 25, procedimiento 2, se dan los rendimientos obtenidos en nuestro caso al usar en dos extracciones diferentes dicho procedimiento. Sin embargo los resultados siguieron siendo variables.

En la misma Tabla 25 y bajo la denominación de "procedimiento mixto" figuran los rendimientos de HA separada luego de 72 horas de diálisis y de HA obtenida de la solución remanente por el procedimiento 2. De los datos se puede deducir que: (a) el calentamiento y poste-

rior estabilización produce un nuevo precipitado en cantidad mucho mayor que la original, obteniéndose un producto clasificado como HA que, sin este tratamiento, sería HB y/o HC; (b) los rendimientos de HB y HC no disminuyen en forma equivalente y por lo tanto el aumento de HA no se hace "numéricamente" a expensas de las mismas. A este respecto cabe mencionar que las variaciones en los rendimientos totales observadas (ver más adelante) no permiten concluir si efectivamente no hubo una disminución en los porcentajes de HB y HC al incrementarse por este tratamiento (procedimiento 2) el porcentaje de HA.

Por otra parte es importante destacar que los trabajos de Gaillard (1965) y los de Blake y col. (1971), se realizaron con hemicelulosas A típicas de pastos, es decir cadenas lineales de unidades de xilosa con algunas ramificaciones cortas de arabinosa y de ácido 4-O-metil-glucurónico y trazas de galactosa, mientras que nuestra hemicelulosa A tiene como azúcares principales (Tabla 27) arabinosa (34,2 %), manosa (16,3 %) y ácido galacturónico (22,8 %) junto con un 29,0 % (p/p) de proteínas, y por lo tanto es posible la presencia de productos más complicados.

Finalmente, además de la irreproducibilidad del fraccionamiento HA/HB, en nuestro caso se observó variación en los rendimientos totales, es decir, en la cantidad de material extraído. Bajo este aspecto caben tres comentarios: (a) el material que se extrajo no fue sometido previamente a tratamientos agresivos (por ejemplo, la deslignificación) y por lo tanto lo extraído es tan parecido al original en la semilla como lo permite la extracción con álcali (ver Efectos de la extracción en medio alcalino, pág. 48); (b) la gran cantidad de material nitrogenado extraído corresponde en su mayor parte a proteínas que acompañan a los hidratos de carbono y fueron retenidas a través de todos los fraccionamientos y pruebas de homogeneidad; (c) la difusión parcial de los productos extraídos a través de la membrana de diálisis (ver Apéndice, pág. 212). En consecuencia, esta incertidumbre hace difícil obtener una base para la comparación de las fracciones respecto de las distintas extracciones.

Nuestros resultados, en general, concuerdan más con los obtenidos por Aspinall y col. (1967a) con cotiledones de Glycine max. Luego de remover las proteínas con hidróxido de sodio 0,2 % a temperatura ambiente, extrajeron el material remanente con solución de EDTA 2 % a pH 5,1 y obtuvieron una solución de polímeros de los que precipitaron la fracción 1 al acidificar a pH 4,5 y la fracción 2 por adición de eta-

no1 (Tabla 50). El residuo fue extraído con oxalato de amonio 0,5 % a 90 C y repitiendo el fraccionamiento obtuvieron las fracciones 3 y 4. La subsiguiente extracción con hidróxido de sodio 5 % a temperatura ambiente y fraccionamiento, dio las fracciones 5 y 6. Todos los productos dieron por hidrólisis mezclas similares de monosacáridos: ácido galacturónico, galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa, ramnosa y trazas de glucosa, 2-O-metil-xilosa y 2-O-metil-fucosa.

Tabla 50. Comparación de los porcentajes obtenidos y de la distribución del contenido en proteínas para las fracciones aisladas de cotiledones de Glycine max en dos series de extracciones distintas.

Fracción	Extracciones			
	1		2	
	ga	Proteínas ^b	ga	Proteínas ^b
1	0,6	66,6	0,7	55,3
2	8,1	9,4	6,9	6,0
3	0,2	81,4	0,1	72,5
4	0,2	7,2	0,1	6,8
5	9,1	68,7	6,5	80,0
6	6,8	3,4	1,9	2,3
Residuo	5,8		6,0	
Total	30,8		22,2	

^a Respecto al producto desgrasado.

^b % Nitrógeno total x 6,25.

Resultados similares también fueron encontrados por Pang Way y Richards (1971) con las semillas de Stylosanthes humilis (Tabla 51), ya que éstas contienen 6 % de sustancias pécticas, la HB contiene una elevada proporción de arabinosa (no usual en base a su definición, ver Hemicelulosas, pág. 8) probablemente como copolímero, y la HC es predominantemente de naturaleza proteica.

Tabla 51. Contenido en nitrógeno de los extractos de semillas de Stylosanthes humilis.

Fracción	Nitrógeno (%)	Proteínas ^a (%)
Polisacáridos solubles en agua caliente	15,2	95
Pectinas	6,5	40
Hemicelulosa C	10,7	67

^a % Nitrógeno x 6,25.

SUSTANCIAS PECTICAS

La extracción con oxalato de amonio del residuo remanente de extraer los galactomananos con agua a 50 C, dio un rendimiento del 20% (fracción P, Tabla 29) en sustancias pécticas. También en este caso se produjeron y/o extrajeron productos de bajo peso molecular ya que durante la diálisis se observó el pasaje de sustancias conteniendo hidratos de carbono a través de la membrana.

El producto extraído contiene proteínas cuya composición en aminoácidos (Tabla 28) es similar a la composición de las proteínas que acompañan a las hemicelulosas, especialmente a la HB por su mayor contenido en ácido glutámico y arginina (relación a/b de 2,8).

El polisacárido contiene los ocho monosacáridos comunes a las hemicelulosas (Tabla 27) siendo la arabinosa el más importante (42,5%) y junto con el ácido galacturónico y la manosa constituyen el 84 % de los azúcares componentes. Su composición se asemeja a la de HA (Tabla 27) en la cual estos tres azúcares forman el 73 % del polisacárido, aunque debido a los menores porcentajes con que aparecen los otros componentes, la fracción P resulta mejor definida. Desde el punto de vista estructural, la importancia de la arabinosa y el ácido galacturónico en la composición de P indican que ésta podría ser clasificada como una verdadera sustancia péctica (ver Sustancias pécticas, pág. 7), coincidiendo entonces la definición operativa adoptada con la definición molecular. Sin embargo, es de notar la presencia de manosa y glucosamina que no son componentes típicos de estos polisacáridos, y la ausencia de ramnosa.

A fin de compararla con las hemicelulosas, la fracción P fue fraccionada en el producto insoluble en agua (PA), el producto remanente insoluble en acetona 66 % (PB) y el producto restante (PC). La Tabla 29 permitió obtener las conclusiones que se detallan a continuación.

La fracción PC está prácticamente constituida por proteína y difiere por lo tanto de la HC cuyo contenido en proteínas varía de un 11 a 74 % (Tabla 26). La falta de hidratos de carbono es consistente con lo encontrado por otros autores con las fracciones HC provenientes de materiales previamente deslignificados con clorito de sodio-ácido acético a 75 C. Tal el caso de la HC obtenida de pastos de Panicum maximum y Heteropogon contortus y de las variaciones Q57 y Q63 de caña de azúcar (Blake y Richards, 1970), en las que se encontró un contenido en hidratos de carbono del 2 %, y de la leguminosa Stylosanthes humilis (Pang Way y Richards, 1971) que presenta un porcentaje de hidratos de carbono menor del 5 % junto con una alta proporción de proteínas (67 %).

La fracción PA se obtuvo con un rendimiento (3 %) similar al encontrado para la HA (Tabla 25), aunque presenta un contenido en proteínas (15,0 %) menor que ésta.

El alto rendimiento de PB (15,3 %), cuyo contenido en proteí-

nas es del 20,6 %, establece una diferencia notable con los rendimientos tres o cuatro veces menores de HB (Tabla 25). Esta diferencia se acentúa si se calculan los rendimientos en función del contenido total en hidratos de carbono, ya que el porcentaje de proteínas de HB se eleva al 46,9 %. En consecuencia la fracción PB es la representativa de las sustancias péclicas de las semillas de Gleditsia triacanthos.

Por otra parte, si se compara el rendimiento de HB con el de HA y HC, vemos que en nuestro caso no existe la marcada preponderancia que se observó en el caso de las semillas de Stylosanthes humilis antes mencionada, en las que el rendimiento de HB es doce veces mayor que el de HA. Este resultado es el comunmente encontrado en los rendimientos de HA y HB extraídas de otras partes de los vegetales. Las pectinas se aislaron de dichas semillas con muy bajo rendimiento (5,9 %) y contienen un 40 % de proteína (Tabla 51). Están constituidas por un 17 % de azúcares neutros de los cuales el 13 % es arabinosa y en cantidades mucho menores aparecen ramnosa (1 %), xilosa (1 %) y galactosa (2 %). En cambio la HB está formada por un 74 % de azúcares neutros, siendo los más importantes xilosa (46 %) y arabinosa (14 %), y en menores proporciones aparecen glucosa (7 %), galactosa (4 %), ramnosa (2 %) y manosa (1 %). En ambos casos no se detectaron fucosa ni glucosamina y no se dosaron ácidos urónicos.

Dado que todos los monosacáridos componentes de P lo son también de HA y HB, y que los tres azúcares que constituyen el 84 % de la primera son componentes importantes de HA y HB (no se usa HC como patrón de comparación ya que se supone que esta fracción se origina por degradación de las dos anteriores o de un fragmento común, y pueden haberse destruido algunos azúcares con la consiguiente concentración de otros), y teniendo en cuenta la imprecisión de los métodos de extracción en lo que a definición molecular se refiere, puede concluirse que en ambos casos (P y H) se está extrayendo el mismo tipo de sustancia y que las principales características de los productos derivarían fundamentalmente del método empleado (ver Extracción de los polisacáridos, pág. 43). Si esto es cierto, la extracción en forma secuencial, primero con un método y sobre el residuo, con el otro, daría rendimientos que se compensarían.

En efecto, cuando se realizaron las dos secuencias (Tabla 30) se observó que la extracción de P posterior a H daba rendimientos aproximadamente veinte veces menores que la extracción directa de P. Esto indicaría que el producto que debía extraerse en P fue extraído en H,

o que el tratamiento alcalino lo había insolubilizado.

Los efectos más probables de la extracción en medio alcalino son: (ver pág. 48) la degradación alcalina tipo "peeling", las reacciones de β -eliminación de uniones glicosídicas a serina y treonina y la trans-eliminación de ácidos urónicos, la hidrólisis de las uniones éster de los grupos acetilos de los azúcares y de los metilos de los ácidos urónicos, y las consiguientes rupturas de las uniones químicas entre los distintos polímeros componentes. Debe recordarse que la hidrólisis de los ésteres urónicos disminuye la β -eliminación, ya que los polímeros de ácido galacturónico no esterificado son más resistentes (Albersheim, 1959). Lo importante es que los efectos mencionados conducen a una mayor solubilización y por lo tanto al menor rendimiento de P en la secuencia N° 1 (Tabla 30).

Por otra parte es de notar que el rendimiento de P en la secuencia N° 1 (1,2 %) es idéntico al que restaba de H luego de tres extracciones sucesivas (1,4 %, ver Descripción de los resultados obtenidos, pág. 59), lo que permite suponer que es este producto lo que se extrajo como P.

Si examinamos la secuencia N° 2, vemos que el rendimiento de H es también menor que en la secuencia N° 1 (Tabla 30), aunque esa disminución no llega al 100 %. Esto puede explicarse sabiendo que, si bien las soluciones de oxalato de amonio (pH 6-7) tienen la acción degradativa tipo β -eliminación antes mencionada para solubilizar las pectinas, ésta es de una magnitud mucho menor que las degradaciones producidas en medio alcalino.

El hecho de que el porcentaje de residuo luego de la extracción sea el mismo (Tabla 30) indica que los totales extraídos en ambos casos son iguales. La diferencia observada puede adjudicarse al material de bajo peso molecular que se pierde en las diálisis y que debe provenir de los procesos de degradación mencionados. Los alcances de la degradación producida están reflejados en el porcentaje de producto que se pierde: 40 al 70 % del extraído.

Además la degradación explica la aparición de cantidades apreciables de oligómeros en la HC y su ausencia en PC, y la irreproducibilidad de los rendimientos (Tabla 25) ya que tanto la extracción como la degradación dependen, entre otros factores, de una serie de variables impredecibles de tipo experimental (tamaño de las partículas, tiempo de contacto entre el material y el reactivo, penetración de este último, cantidad de oxígeno presente, etc.)

La determinación cuali y cuantitativa de lo que podría obtenerse en una extracción no degradativa, se realizó con solución de urea 7 M a temperatura ambiente. Esta solución rompe las uniones hidrógeno (Tanford, 1968, 1969), posibilitando la extracción de sustancias no unidas covalentemente al residuo insoluble de extraer los galactomananos. Además, es de suponer que la degradación de las pectinas en soluciones neutras calientes es mucho menor que en medio alcalino. El producto extraído (fracción U, Tablas 27 y 28) presenta en la parte de hidratos de carbono un bajo porcentaje de ácido galacturónico (4,4 %) lo que confirmó la ausencia de reacciones de degradación y por lo tanto la contaminación con sólo cantidades menores de pectinas, y está formado en un 91,0 % por arabinosa (31,6 %), xilosa (25,8 %), manosa (22,9%) y galactosa (10,5 %). A semejanza de P contiene un 23,9 % de proteínas y su composición en aminoácidos es similar a la de HA, aunque con mayor proporción de ácido glutámico y arginina; la relación a/b es semejante (1,6).

En razón de su composición, la fracción U parecería estar formada por polisacáridos mejor definidos y como consecuencia del procedimiento de extracción utilizado, no estarían unidos al resto de los componentes (insolubles) por uniones covalentes. Cabe mencionar que este producto representa sólo un 5 % del extraído en P, y por lo tanto el resto del producto (enriquecido en ácido galacturónico respecto de U) estaría unido por enlaces covalentes. A este respecto, Monro y col. (1974) encontraron que parte de los polímeros de paredes celulares despectinizadas de hipocotilos de Lupinus angustifolius, pueden ser removidos con reactivos que producen la ruptura de las uniones no covalentes pero no de las glicosídicas (urea, dodecilsulfato de sodio y tiocianato de guanidonio), pero la mayor parte requiere condiciones más vigorosas para su extracción. Si bien Keegstra y col. (1973) sugirieron que los polisacáridos y proteínas de la matriz de la pared primaria están casi todos unidos glicosídicamente para formar un complejo macromolecular (ver Estructura molecular de las paredes celulares, pág. 35), en el otro extremo Rees y Wight (1969) proponen que las paredes celulares intactas pueden ser completamente dispersadas sin romper las uniones covalentes.

Del análisis de las fracciones insolubles en medio alcalino (S_h) y luego del tratamiento subsiguiente con oxalato de amonio (S_{hp} , Tablas 27 y 28), llaman la atención los porcentajes de hidroxiprolina en el primer caso (la fracción S_{hp} no fue analizada en cuanto al conte

nido en aminoácidos) y de glucosamina en ambas (16,8 % para S_h y 20,5% para S_{hp}). La presencia de glucosamina y los porcentajes en estas fracciones insolubles coinciden con lo encontrado para la hemicelulosa B (ver Hemicelulosa B, pág. 128) sobre la existencia de cadenas de D-glucosamina con uniones β -(1 \rightarrow 4)-.

Respecto de la hidroxiprolina, es sabido (Selvendran y col., 1975) que la mayor parte de la proteína remanente en la holocelulosa de semillas, se extrae rápidamente con álcali frío y son relativamente pobres en hidroxiprolina. El aislamiento de las proteínas de las paredes celulares de tejidos vegetales es difícil debido a que están embebidas en la matriz y fuertemente unidas a los polímeros de la misma (ver Estructura molecular de las paredes celulares, pág. 33). Monro y col. (1974) encontraron que las glicoproteínas que contienen hidroxiprolina no pueden ser extraídas con solventes que sólo producen la ruptura de las uniones hidrógeno; Lamport (1969) usó enzimas o hidrólisis con solución de hidróxido de bario (Lamport, 1967) para extraerlas; Heath y Northcote (1971) emplearon la hidrazinólisis para obtener los glicopéptidos ricos en hidroxiprolina de la fracción de la α -celulosa (fracción insoluble en álcali 1,75 %); Monro y col. (1976) estudiaron una fracción rica en hidroxiprolina y de bajo contenido en serina, resistente a la extracción con álcali (KOH 24 %, a 18-22 C durante 24 horas), de los hipocotilos de Lupinus angustifolius.

Asimismo, Selvendran y col. (1975) hicieron uso del tratamiento con clorito de sodio-ácido acético a 70 C para solubilizar las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina asociadas con la fracción de la α -celulosa de las paredes celulares del parénquima de Phaseolus coccineus; sugirieron que esas glicoproteínas son fragmentos de una proteína macromolecular y según sus resultados (Selvendran, 1975 b), las proteínas asociadas con la hemicelulosa A son relativamente pobres en hidroxiprolina (3,2 moles %), sobresalen los valores de los ácidos aspártico y glutámico y de leucina, y son esencialmente similares a las asociadas con las sustancias pécticas (a/b 1,7). Parecería por lo tanto que en ese caso la parte proteica de la holocelulosa está "unida" a ésta por una unión sensible al álcali como un éster, y la escasa proteína residual remanente en la α -celulosa, que se aproxima en conformación a una polihidroxiprolina con cadenas laterales de arabinosa y galactosa (Selvendran, 1975 b), no estaría unida por fuerzas electrostáticas o uniones hidrógeno. En nuestro caso, en concordancia con esta serie de apreciaciones, ninguna de las fracciones extraídas (U, P o H) mostró porcentajes detectables de hidroxiprolina y en cambio el residuo insoluble, aunque presenta un contenido bajo de proteínas (aprox.

5,3 %), está formado en su parte proteica por un 8,3 % de hidroxiprolina.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en las distintas extracciones, es posible suponer la existencia de los siguientes tipos de uniones entre los polímeros: (1) uniones hidrógeno rotas por la urea con liberación del 1 % del material polimérico de la semilla; (2) uniones estabilizadas por los iones Ca^{++} que involucran a los ácidos urónicos. Cuando éstas son destruidas por tratamiento con oxalato, se libera la fracción representativa de las sustancias pécticas (20 % de la semilla entera); (3) uniones lábiles al álcali (uniones hidrógeno, enlaces susceptibles de reacciones de β -eliminación, reacciones tipo "peeling") que liberan porcentajes variables (6 a 14 %) de sustancias pécticas y hemicelulosas; (4) uniones estables en el medio alcalino utilizado (KOH 10 %, a temperatura ambiente durante 24 horas) y al oxalato de amonio (13 % de la semilla entera). Por lo tanto, puede afirmarse que un número diferente de enlaces covalentes y no covalentes están involucrados en la unión de los polímeros, aunque de un modo probablemente distinto al propuesto en su modelo por Keegstra y col. (1973).

En base a la composición de estas fracciones y los diferentes tipos de enlaces involucrados, es de suponer que estamos en presencia de un complejo polisacárido-proteína. Los estudios efectuados posteriormente (ver a continuación la discusión de los resultados) confirmaron en su mayor parte esta suposición de partida. Las evidencias sobre la existencia de este tipo de complejos, localizados tanto en las paredes celulares como intracelularmente, han sido informadas por varios autores (Fincher y col., 1974, y referencias allí citadas). En nuestro caso permanece hasta el momento incierta la localización subcelular del mismo, es decir si este complejo está relacionado estrictamente con las paredes celulares o si lo está también con los componentes citoplasmáticos.

Con respecto a esto último cabe recordar que, la posibilidad de efectuar una generalización sobre la organización de los constituyentes aislados se ve por lo general complicada, y también en nuestro caso, por la agregación que puede producirse entre los componentes luego de la extracción. Más aún, cuando se trata de estudiar los polisacáridos de las paredes celulares, la dificultad en este sentido surge de la adsorción no específica de los componentes citoplasmáticos y de la carencia de métodos adecuados para asegurar el aislamiento de los materiales de las paredes celulares libres de las proteínas citoplasmáti-

cas. En este sentido sólo se conoce un método que permite obtener una preparación de las paredes celulares virtualmente libre de estos contaminantes (extracción secuencial de los tejidos frescos molidos con dodecilsulfato de sodio 1,5 % (p/v) seguido de fenol, ácido acético, agua 2:1:1 (p/v/v)) y es de publicación reciente (Selvendran, 1975 a).

La mayoría de los trabajos detallados sobre este tema se han realizado sobre tejidos relativamente simples como los cultivos de células en suspensión (ver Estructura molecular de las paredes celulares, pág. 35). A pesar de que la información obtenida a partir de ellos puede ser muy útil, no puede ser usada para efectuar generalizaciones debido a que los cultivos de células y las células de los vegetales ordinarios difieren en muchas formas. Selvendran (1975 b) propuso entonces el uso de métodos que permitan el aislamiento y caracterización de las glicoproteínas y de los complejos polisacáridos-proteínas de las paredes celulares de vegetales superiores, en la forma más cercana posible a las paredes en el estado natural. A tal efecto, usó un tejido relativamente simple, homogéneo (parénquima de semillas maduras) sin sujetarlo a la deslignificación ya que está libre de lignina. Bajo estos aspectos es lo más parecido al análisis efectuado en nuestro caso sobre las semillas de Gleditsia triacanthos, pues si se desprecia la contaminación con paredes secundarias provenientes de la cubierta, tanto el endosperma como el embrión son tejidos parenquimáticos.

H E M I C E L U L O S A A

La composición en hidratos de carbono de la hemicelulosa A, dada en la Tabla 27, muestra que está formada por ocho azúcares de los cuales la arabinosa, la manosa y el ácido galacturónico son cuantitativamente los más importantes y constituyen el 73,3 % del total. Desde el punto de vista de su composición difiere de las hemicelulosas A obtenidas de otras semillas de leguminosas (Tabla 4) en la ausencia de ácido glucurónico y el bajo contenido de xilosa; más aún, su composición no es comparable con ningún tipo de hemicelulosas A extraídas de otros órganos vegetales de leguminosas o de otras familias (ver Hemicelulosas, pág. 8; Whistler y Gaillard, 1961; Gaillard, 1965; Burke y col., 1974).

Si en función de lo dicho anteriormente con respecto a la indeterminación de los métodos de extracción (ver Polisacáridos insolubles en agua, pág. 106), comparamos la composición de la hemicelulosa A con la de las sustancias pécticas (Pág. 7 y Tabla 3) encontramos similitud

en lo que respecta a los altos contenidos de arabinosa y ácido galacturónico, pero no en cuanto al contenido en manosa, constituyente no usual de las sustancias pécticas, y a la ausencia de rramnosa.

Debe destacarse, por otra parte, la presencia en cantidades significativas de un aminoazúcar, la glucosamina, que no se ha encontrado nunca, hasta donde llega nuestro conocimiento, en hemicelulosas o pectinas.

En lo que respecta a la parte proteica, su composición presenta las características generales de las proteínas de reserva de las leguminosas, a saber: alto contenido de ácidos dicarboxílicos (28,7 %) y de aminoácidos básicos (14,8 %), principalmente lisina y arginina, y de leucina (9,1 %). Esta composición, común a las proteínas que acompañan a los galactomananos, muestra sin embargo diferencias al calcular la relación a/b (1,9) con la de los mismos (3,1) y es notablemente cercana a la de las proteínas de Pisum sativum (1,8, Tabla 7).

La homogeneidad de la hemicelulosa A se determinó por distintos métodos: (a) electroforesis sobre papel de fibra de vidrio; (b) ultracentrifugación; y (c) variadas tentativas de fraccionamiento.

La determinación de la homogeneidad se vio complicada por la insolubilidad en agua del producto. Además se observó que también tendía a insolubilizarse en medio alcalino. Esta insolubilización debe explicarse por causas de tipo físico, tales como la asociación molecular, y no químico, ya que se encontró que el porcentaje de producto insoluble en un dado medio (KOH 10 %) era función del procedimiento de solubilización (agitación manual esporádica o mecánica continua) hasta tal punto que dichos porcentajes variaban en uno y otro caso del 72-81 % (Tabla 31) al 2-8 % (Tabla 32). Esta tendencia a la asociación molecular explica también los mayores rendimientos de HA encontrados cuando se utiliza el Procedimiento 2 (Tabla 25), es decir el calentamiento de la solución y posterior estabilización antes de proceder al fraccionamiento en HA, HB y HC. En esta forma se facilita la organización de los agregados moleculares y por lo tanto se incrementa la insolubilidad. Por otra parte esta hipótesis permite explicar el hecho de que las partes de la fracción HC que resultaron dializables en los intentos de fraccionamiento (ver más adelante, pág. 205 y Apéndice, pág. 212), no lo fueron durante las diálisis de neutralización por estar en contacto con moléculas mayores.

La precipitación de la HA durante la neutralización de los extractos alcalinos depende, en parte, de la protonación de los grupos carboxilos de manera tal de permitir la agregación de las cadenas de polisacáridos (Rees, 1969). Además, la tendencia a la asociación es característica de las hemicelulosas A, ya que suelen estar formadas por polímeros lineales (los ácidos urónicos serían las cadenas laterales) y esto explicaría su precipitación en medio neutro. La asociación de xiloglucanos, por ejemplo, con las fibrillas de celulosa es parte esencial de la hipótesis de Albersheim (ver Estructura molecular, pág. 35) sobre la estructura de las paredes primarias de las dicotiledóneas. En general, los polisacáridos clasificados como hemicelulosas de paredes celulares (xilanos, araboxilanos, mananos, glucomananos y galactoglucomananos) poseen estructuras apropiadas para la formación de uniones hidrógeno con las cadenas de celulosa (Blake y Richards, 1971 a; Grant y col., 1969). Blake y Richards (1971 b), trabajando con soluciones acuosas de hemicelulosas de diferentes fuentes, encontraron evidencias sobre la agregación molecular de los polisacáridos y la dependencia de la asociación, e incluso de los cambios en la conformación, con la "historia térmica" de las soluciones. Es notoria la influencia de la agregación molecular en las propiedades de estos polímeros y en el fraccionamiento de los mismos.

Es sabido, por otra parte, que el fenómeno de la asociación depende de la estructura molecular y que la facilidad de adosamiento, y por ende la formación de uniones hidrógeno, varían con la forma de la molécula. Así moléculas globulares no se asocian mientras que las lineales tienden a hacerlo. Dentro de las lineales, la facilidad de adosamiento depende de los impedimentos estéricos producidos por los mayores o menores porcentajes de cadenas laterales, del tamaño y estructura de las mismas, y de su inserción, regular o irregular, sobre el esqueleto central. La celulosa, por ejemplo, caso límite de cadena lineal sin impedimentos laterales, es completamente insoluble y forma zonas cristalinas. En cambio, el xiloglucano constituyente de las paredes primarias de células de Acer pseudoplatanus (Bauer y col., 1973) sólo puede formar una única capa de xiloglucano asociado a la superficie de las fibrillas de celulosa, debido a que las cadenas laterales de fucosil-(1→2)-galactosil-(1→2)-xilosa, al doblarse sobre el lado de la cadena del glucano no asociado con la celulosa, impiden el acercamiento de otras moléculas.

En cuanto a los resultados obtenidos de los estudios de homo-

geneidad puede afirmarse que, si bien tanto la electroforesis como la ultracentrifugación mostraron la presencia de un único tipo de sustancia, debe recordarse que estos resultados están limitados en razón de que: (a) la muestra analizada puede no representar el total de HA, ya que parte permaneció insoluble en el solvente (KOH 30 %), si no se tiene en cuenta el fenómeno de asociación antes discutido; (b) la relativa apertura de la mancha obtenida por electroforesis parecería indicar polidispersión; y (c) la corrida se efectuó en la ultracentrífuga durante 31 minutos solamente (ver Descripción de los resultados obtenidos, pág. 66) lo que impidió que el pico se separara totalmente del origen.

Las tentativas de fraccionamiento merecen un comentario aparte. Las primeras se llevaron a cabo suspendiendo HA en KOH 10 % (Tablas 31 y 32) y separando el insoluble cuyo porcentaje, como ya comentáramos, depende fundamentalmente del método de solubilización empleado. Ambas fracciones, soluble (HA_{10}) e insoluble (HA_1), se analizaron por electroforesis (Figura 23) y en ambos casos se observaron manchas únicas de movilidades parecidas, aunque al estar más difundida la correspondiente a HA_{10} sugiere una mayor polidispersión.

De las Tablas se obtuvieron las siguientes conclusiones: las fracciones solubles contienen más proteínas que las insolubles; los poderes rotatorios de HA_{10} , aunque varían en ambos fraccionamientos y su interpretación se ve complicada por la presencia de proteínas, son relativamente bajos y negativos, lo que sugiere un predominio de la configuración β - para las uniones glicosídicas de las unidades de D-hexosas y D-xilosa y α - para las de L-arabinosa y L-fucosa; la hidrólisis y cromatografía en papel de ambas fracciones indicó la misma composición y ésta a su vez fue semejante a la del producto sin fraccionar; los dosajes de hexosas y ácidos urónicos revelaron cierta variación en el contenido de ambas fracciones.

Cuando las soluciones de HA_{10} fueron sometidas al fraccionamiento de O'Dwyer (separación en hemicelulosas A, B y C) sólo un 43 a 48 % (Tabla 32) se recuperó como hemicelulosa A, lo que proporcionó otro ejemplo de la ya comentada imprecisión de esta separación.

En base a estas experiencias se eligió para la hemicelulosa A, que siempre resulta difícil de purificar por su limitada solubilidad, un fraccionamiento más detallado, extrayendo HA con soluciones alcalinas de concentración creciente. Se obtuvieron así las fracciones indicadas en la Tabla 33. Debe recordarse que por la forma en que fuera solubilizada HA, ésta debe precipitar cuando sus soluciones alcalinas son llevadas a neutralidad. Esto ocurrió con HA_{15} y HA_{20} , en proporciones parciales ya que de HA_{15} sólo se insolubilizó el 15 %, porcentaje

que subió a un 24 % para HA₂₀. Las demás fracciones permanecieron solubles a pH neutro. Las conclusiones obtenidas de este fraccionamiento fueron las que se detallan a continuación.

El porcentaje de material solubilizado es función directa de la concentración de álcali usado a tal efecto (Figura 24, A), al igual que el porcentaje de nitrógeno total y el de glucosamina (Figura 24, A). Por lo tanto la no existencia de superficies de discontinuidad con respecto a estas tres propiedades, señala la homogeneidad de HA (compárese por ejemplo con la Figura 24, B).

Los valores de los poderes rotatorios indican, como en los fraccionamientos previos, un predominio de la configuración β - para las uniones glicosídicas de las unidades de D-hexosas y D-xilosa, y α - para las de L-arabinosa y L-fucosa.

La determinación de los azúcares componentes de HA₁₀, HA₂₀ y HA₃₀ (Tabla 34) muestra un cuadro cualitativamente similar para las tres fracciones entre sí y con el producto sin fraccionar. En cambio, cuantitativamente se observan diferencias considerables: el porcentaje de arabinosa varía del 34,2 % en HA a 51,5 % en HA₂₀, y el de glucosamina del 6,5 % en HA a 22,7 % a HA₃₀. Conviene destacar los altos valores que presenta este aminoazúcar en todas las fracciones, incluso en las de bajo porcentaje de proteínas (HA₂₀ y HA₃₀), dado que hasta ahora, no se había encontrado en polisacáridos de origen vegetal. Sin embargo, su detección sería algo más explicable, aunque todavía inusitada por los altos porcentajes encontrados, si suponemos que estamos en presencia de glicoproteínas (ver más adelante, pág. 143).

Como conclusión de los estudios de homogeneidad la hemicelulosa A se presenta como una sustancia homogénea pero altamente polidispersa en lo que respecta a la variación porcentual de los azúcares componentes y de la proteína acompañante. Esto último permite explicar la variación en los porcentajes de nitrógeno correspondientes a las distintas extracciones (Tabla 26). Además variaciones tan importantes en la composición hacen todavía más imprecisa la separación entre las hemicelulosas y las sustancias pécticas, y reafirman la creencia de que se trata de una única sustancia que se presenta con aspectos cuantitativamente diferenciales de acuerdo con el método de trabajo utilizado.

La hidrólisis ácida parcial de la hemicelulosa A en condiciones suaves, específicas para la ruptura de uniones furanósicas, dio re

sultados positivos. Debe destacarse que la misma se realizó en un sistema bifásico ya que HA es insoluble en el medio de hidrólisis; por lo tanto, su extensión está limitada por factores de difícil control como la penetración del reactivo en los agregados moleculares, solubilización parcial de los mismos, etc. Esto explicaría los rendimientos diferentes obtenidos para las fracciones en la hidrólisis de muestras distintas.

La hidrólisis analítica se llevó a cabo en forma exhaustiva, para lo cual fue necesaria una serie de hidrólisis consecutivas sobre la misma muestra hasta obtener porcentajes despreciables de producto solubilizado. De los resultados se extrajeron las siguientes conclusiones: (a) el producto insoluble degradado, obtenido con un rendimiento del 50 % (Tabla 35), contenía sólo trazas de arabinosa y por lo tanto este monosacárido está presente en el producto original principalmente en forma de uniones furanósicas; (b) el tratamiento completo de hidrólisis parecería marcar, en forma aproximada, dos etapas: la primera determinada por los 20 minutos iniciales de la primera hidrólisis, en la que se observa una rápida solubilización correspondiente al 85 % de la hidrólisis, y la segunda donde la solubilización es más lenta y dificultosa y corresponde a las hidrólisis posteriores. Este resultado indicaría la presencia de arabinosa en las cadenas laterales y unidades terminales, y también formando parte de cadenas principales en la vecindad del ácido galacturónico (ver a continuación); (c) entre los productos de hidrólisis se detectaron también oligosacáridos que por su comportamiento cromatográfico parecerían tener distintos grados de polimerización. Esto está de acuerdo con la producción, en las hidrólisis preliminares, de oligosacáridos que revelaban como pentosas y por hidrólisis daban arabinosa como único azúcar neutro. Asimismo, el análisis del producto degradado insoluble de la hidrólisis preparativa (ver a continuación) indicó que la hidrólisis furanósica no sólo libera arabinosa sino también cantidades considerables de ácido galacturónico. Esto correspondería a la producción de oligosacáridos formados por estos dos azúcares y a la presencia en el producto original de ácido galacturónico unido a la arabinosa, la que a su vez tiene uniones furanósicas.

La hidrólisis parcial realizada en escala preparativa permitió separar cuatro fracciones: (a) un residuo insoluble, (b) una fracción soluble en agua pero insoluble en presencia de carbonato de bario, (c) una fracción soluble en agua pero insoluble en etanol 33 %, y (d) una fracción soluble en etanol 33 %.

La composición de las fracciones a y c (Tabla 36) indicó que son similares ya que no sólo contienen los mismos azúcares (salvo glucosamina), sino que las proporciones de éstos son semejantes. Las mayores diferencias se observan en los porcentajes de arabinosa y glucosa. Ambos fragmentos contienen cantidades considerables de proteína (37,5% y 27,5 %, respectivamente). Estos datos sugerirían que dichos fragmentos no son parte de una misma molécula y por lo tanto no fueron separados entre sí durante la hidrólisis por la ruptura de uniones covalentes, sino que provendrían de moléculas diferentes, del mismo tipo, unidas en un complejo molecular por uniones hidrógeno y/o fuerzas electrostáticas débiles, parte de las cuales se solubilizaron en el medio de hidrólisis.

En el caso de las fracciones b, la amplia preponderancia de arabinosa, galactosa y ácido galacturónico (68,0 %) en una de ellas y arabinosa y ácido galacturónico (63,6 %) en la otra, mostró que las mismas pueden ser definidas estructuralmente como fragmentos de las sustancias pécticas, y a diferencia de lo que ocurre con los fragmentos a y c, se producirían a partir de la molécula original fundamentalmente por la ruptura de las uniones furanósicas. La presencia de los restantes azúcares puede ser justificada en base a las siguientes razones: (a) para visualizar la importancia relativa de los componentes, la composición porcentual molar (Tabla 36) puede no ser la mejor forma de expresar los datos obtenidos, ya que considerándola en forma absoluta conducen a pesos moleculares aproximados de 15.000, en el cual aparecen como significativos azúcares que no serían importantes si el peso molecular fuera mucho menor. Si suponemos que las fracciones b corresponden a los oligosacáridos que en las hidrólisis analíticas revelaban como pentosas y daban por hidrólisis arabinosa como único azúcar neutro, el hecho de que en la cromatografía se desplazaran del origen señalaría un peso molecular bajo, y por lo tanto, los azúcares que están en bajo porcentaje se encontrarían distribuidos en moléculas diferentes; (b) que dichos azúcares no pertenezcan a las fracciones pécticas sino que aparezcan como contaminaciones de pequeños fragmentos producidos y/o solubilizados en el medio de hidrólisis, o que acompañen a fracciones proteicas que han sufrido el mismo proceso de insolubilización y posterior solubilización.

Si se compara la composición de los fragmentos a y c con la del producto original, se observa en ambos casos una disminución de arabinosa, ácido galacturónico y glucosamina. Como los valores de la Tabla corresponden a porcentajes relativos, la disminución del contenido en estos azúcares (47,8 % y 27,9 % para a y c respectivamente)

debe estar compensada por un aumento relativo del mismo orden para los restantes: este es el caso de la fucosa y la galactosa en el fragmento a, mientras que la xilosa ha experimentado una hidrólisis del 30 %. La relación molar de los azúcares hidrolizados de dicho fragmento es de 1:2:4:8 (xilosa:glucosamina:ácido galacturónico:arabinosa). Paralelamente se observa un aumento relativo de manosa y glucosa que alcanza a un exceso del 82 % y a casi el 300 % respectivamente.

Si se aplica el mismo razonamiento al fragmento c, se observa que la galactosa no varía y que disminuyen arabinosa, fucosa, xilosa, ácido galacturónico y glucosamina en una relación molar aproximada de 13:1:2:11:4. En cambio la manosa y la glucosa aumentaron nuevamente por encima del valor esperado. Nuevamente, como la relación molar de los azúcares hidrolizados en los dos casos son parecidas, se confirmaría que los fragmentos liberados son similares.

La relación molar de los monosacáridos parcialmente hidrolizados en los residuos son para el fragmento a, 1:1:1 (arabinosa:xilosa:ácido galacturónico) y para el fragmento c, aproximadamente 11:6:3:1:1 (arabinosa:ácido galacturónico:xilosa:glucosamina:fucosa). Si consideramos la composición molar de las fracciones b (Tabla 36), vemos que la relación arabinosa:ácido galacturónico es en b (t.a.) de 2 y en b (60 C) de 1 y en consecuencia corresponde respectivamente a lo que se hidroliza de a y c, junto con glucosamina y xilosa, ya que dicha relación es en esos residuos de 1 y 2. (en el producto de partida (HA) es de 1,5).

Debe recordarse que, dada la polidispersidad que manifiestan estos productos, los resultados de la Tabla 36 deben ser considerados como promedio y por lo tanto las deducciones obtenidas a partir de ellos tienen carácter estadístico.

La fracción d, soluble en etanol 33 %, está constituida por arabinosa y sólo trazas de xilosa y galactosa. Además el análisis de esta fracción por pasaje a través de Sephadex G-25 permitió descartar la presencia de fragmentos de mayor peso molecular, tanto disacáridos como oligosacáridos mayores. Si bien las trazas de xilosa y galactosa pueden deberse a hidrólisis no específicas, la hidrólisis masiva de arabinosa solamente puede tener dos explicaciones: (a) parte de la molécula está constituida por un arabano con uniones furanósicas; (b) las moléculas de arabinosa hidrolizadas pertenecen a cadenas cortas o extremos no reductores de cadenas unidas furanósicamente al resto de la molécula. Un ejemplo de este caso lo encontramos en el arabinogalactano extraído de harina desproteneizada de cotiledones de soya (Aspinall y col., 1967), que posee una cadena principal de β -(1-4)-D-galactopir

nosa con ramificaciones en 0-3 de disacáridos de arabinofuranosa. De la misma harina se extrajo también un arabano, ejemplo del primer caso, con una estructura altamente ramificada que contiene residuos arabinofuranósicos con uniones (1→5)- y (1→3)-.

Los resultados obtenidos por oxidación con periodato de la hemicelulosa A indicaron tres hechos importantes: (a) la glucosa no se oxida; esto puede explicarse suponiendo una cadena lineal con uniones (1→3)- o una cadena lineal o ramificada con uniones (1→2)- o (1→4)- siempre que cada uno de los residuos lleve una sustitución tal que impida la oxidación. La resistencia a la oxidación hace poco probable la existencia de uniones (1→6)-, a menos que hubiera uniones (1→3)- sobre la misma unidad; (b) los restantes azúcares neutros (arabinosa, fucosa, xilosa, manosa y galactosa) y la glucosamina son prácticamente destruidos, lo que indica que sus uniones no son (1→3)- ni que las unidades son puntos importantes de ramificación, salvo que las uniones sean (1→6)-; (c) el 65 a 75 % del ácido galacturónico es destruido, con lo que puede suponerse una cadena lineal con dos tipos de uniones, una de ellas (25 a 35 %) de (1→3)-, o una cadena lineal sin uniones (1→3)- pero sustituida en las unidades no oxidadas. Respecto de esta sustitución cabe recordar que el ácido galacturónico no liberado en la hidrólisis furanósica, es totalmente destruido en la oxidación con periodato (ver a continuación), lo que sugeriría que dichas unidades se encuentran sustituidas en el polisacárido original, posiblemente por unidades arabinofuranosílicas.

Por oxidación incompleta con periodato de la hemicelulosa A degradada por hidrólisis ácida parcial (fracción a), se obtuvo un consumo de periodato de 2,3 por mol de ácido fórmico producido. Como cada mol de ácido fórmico producido implica el uso de 2 moles de periodato en la oxidación de una "función glicerol" proveniente de una unidad reductora terminal o de una anhidro hexosa unida (1→6)- no sustituidas, es evidente que la mayor parte de las unidades oxidadas son de este tipo y sólo una pequeña parte del periodato se ha consumido en oxidar 1,2-glicoles.

El análisis de la composición en monosacáridos de las fracciones soluble e insoluble de esta oxidación indicó que, a pesar de las diferencias cuali y cuantitativas, no pueden considerarse como fragmentos de una sola molécula separados por la secuencia de reacciones, sino partes del mismo complejo molecular, algunas de las cuales se solubilizaron tal como se observara durante la hidrólisis furanósica. Es

de notar que en ambos casos los fragmentos insolubles contienen más glucosa y menos ácido galacturónico y/o arabinosa que los respectivos solubles.

Si bien no es posible afirmar si la producción de ácido fórmico fue total, los valores obtenidos, aún suponiendo que son mínimos y que provienen de unidades terminales no reductoras, corresponden a cadenas lineales muy cortas (ocho o menos unidades) suposición consistente con los resultados obtenidos en la determinación del "grado de polimerización" de las fracciones, o a estructuras muy ramificadas.

Cuando ambas fracciones se reoxidaron, se encontró que en la insoluble la oxidación se hizo a expensas de grupos 1,2-glicoles, mientras que en la soluble, como 2 moles de periodato oxidan a 2,2-2,4 unidades anhidro promedio con producción de 1 mol de ácido fórmico, el periodato se utilizó principalmente en la producción de ácido fórmico y por lo tanto la oxidación se llevó a cabo sobre las unidades terminales.

Si se compara la composición inicial con el oxidado insoluble vemos que los azúcares oxidados son, en orden decreciente, arabinosa, xilosa, ácido galacturónico y manosa. Dado que en la posterior oxidación no se produce ácido fórmico, se supone que los terminales de cadena se han oxidado en esta etapa y que algunos de estos azúcares son los que forman dichos terminales de cadena. En el caso del oxidado soluble, se observa que salvo una pequeña disminución de arabinosa y ácido galacturónico, los porcentajes no se alteran sustancialmente, lo que indica que la oxidación ha sido relativamente pareja. La oxidación posterior se produce a expensas de los terminales de cadena.

Debe destacarse que en todo este razonamiento hemos supuesto que, de acuerdo con la producción de ácido fórmico en la primera parte de la oxidación, se tenían cadenas cortas (máximo de ocho unidades). Este concepto se acentúa si, de acuerdo a los resultados de la segunda parte de la oxidación, suponemos que dicho ácido fórmico fue producido sólo por, aproximadamente, la mitad de la muestra. (fracción insoluble, rendimiento 50 %).

H E M I C E L U L O S A B

La hemicelulosa B es, de acuerdo con la definición clásica, aquella hemicelulosa soluble en agua pero insoluble en etanol 75 %. Como ya se comentara en la discusión sobre las "hemicelulosas aisladas", esta definición operativa no puede ser interpretada en términos estruc

turales debido a que la solubilidad o insolubilidad de una fracción en sistemas como el estudiado (ver Hemicelulosa A, pág. 120), es función de las interacciones con otros solutos, en una solución, u otros componentes, en el estado sólido.

El análisis de los monosacáridos componentes de las hemicelulosas B provenientes de extracciones distintas dio resultados equivalentes, y para el estudio posterior se eligió una de ellas como representativa de la hemicelulosa B de semillas de Gleditsia triacanthos.

La composición en monosacáridos está dada en la Tabla 27. A diferencia de las otras composiciones presentadas en este trabajo, la de la hemicelulosa B no se determinó experimentalmente sino que se calculó a partir de las composiciones de las subfracciones "lineal", "ramificada" e insoluble que la componen y en las que fue posteriormente separada (ver más adelante). Si bien los valores de esta composición están afectados de cierto error, la comparación con las composiciones de las hemicelulosas A y C es posible. De ella surge que, desde el punto de vista semicuantitativo, las tres fracciones contienen los mismos azúcares, predominan arabinosa y manosa y poseen pequeñas cantidades de glucosa; a través de estas composiciones no se pueden visualizar diferencias estructurales entre las fracciones.

Las hemicelulosas B de las semillas de otra leguminosa, Vicia faba, fue estudiada por Kawamura y Narasaki (1958), pero sólo informaron la composición cualitativa de un producto no fraccionado (Tabla 4). Las semillas de Stylosanthes humilis (Pang Way y Richards, 1971) presentan un contenido en hemicelulosa B del 3,8 %, cuyo porcentaje de azúcares neutros es del 74 % (ramnosa 2 %, arabinosa 14 %, xilosa 46 %, manosa 1 %, galactosa 4 % y glucosa 7 %) y el ácido urónico, aunque no se estudió en la semilla, fue identificado en otras partes del vegetal como 4-O-metil-glucurónico. Para poder comparar nuestra hemicelulosa B con la de esta semilla, es necesario tener en cuenta el contenido de sustancias pécticas (5,9 %) de las mismas que fueron extraídas previamente. Estas sustancias pécticas contienen solamente un 17 % de azúcares neutros (ramnosa 1 %, arabinosa 13 %, xilosa 1 % y galactosa 2 %)

y un 40 % de proteínas asociadas, siendo el resto ácido galacturónico. Dado que nuestro producto fue extraído directamente con álcali sin el aislamiento previo de las sustancias pécticas, para la comparación con el de las semillas de Stylosanthes humilis debe considerarse entonces el promedio pesado de las dos fracciones (hemicelulosa B y sustancias pécticas) aisladas de las mismas. Este promedio dio, para los azúcares neutros, los siguientes porcentajes (moles %): ramnosa 3 %, arabinosa 35 %, xilosa 49 %, manosa 1 %, galactosa 6 % y glucosa 6 %.

Las diferencias entre las dos composiciones son notorias. El porcentaje más elevado de arabinosa que de xilosa, las altas cantidades de manosa, la presencia de glucosamina y el cuadro general indican sistemas diferentes. Esto está de acuerdo con el hecho de que, si bien la Stylosanthes humilis es una leguminosa, la composición en polisacáridos de sus semillas debe ser distinta a las de Gleditsia triacanthos, ya que, por ejemplo, no se almacenan galactomananos en su albumen; por otra parte, como las semillas fueron sometidas a la deslignificación (clorito de sodio-ácido acético a 75 C) antes de extraer las hemicelulosas, es posible que se produzcan (ver Extracción alcalina, pág. 44) variaciones en el contenido de los polisacáridos o en su composición luego de este tratamiento.

En la Tabla 28 se da la composición en aminoácidos que, como en el caso de los hidratos de carbono, no se determinó experimentalmente sino que se calculó como un promedio pesado de las composiciones de las fracciones componentes (Tabla 43). Cuando se compara esta composición con la de las hemicelulosas A y C se ve que cualitativamente son semejantes aunque cuantitativamente se advierte una diferencia apreciable en los porcentajes de aminoácidos dicarboxílicos. En este caso llegan al 51 % contra el 29 a 34 % en HA y HC debido al incremento de ácido glutámico que pasa de aproximadamente el 20 % en HA y HC al 43 % en HB, y que en dos de las fracciones componentes de esta última constituyen más del 50 % de los aminoácidos totales (Tabla 43). Entre los aminoácidos básicos, la arginina aumenta levemente su porcentaje de 8,9 % (HA) y 7,0 % (HC) a 12,6 %, mientras que los demás disminuyen proporcionalmente. Si examinamos las composiciones en aminoácidos de otras fracciones, encontramos una similitud acentuada, sobre todo en lo que respecta a los porcentajes de ácido glutámico y arginina y consiguientemente la relación a/b, con las proteínas asociadas a las sustancias pécticas.

Como es sabido, usualmente la hemicelulosa B es una mezcla compleja de varios polímeros. En nuestro caso, la electroforesis sobre papel de fibra de vidrio en hidróxido de potasio 30 % mostró dos manchas difusas, una de las cuales no se desplazaba del origen.

Antes de estudiar esta heterogeneidad se intentó "purificar" la HB sometiénola al esquema clásico de separación de las hemicelulosas. De acuerdo con los resultados (Tabla 40) un 6 a 12 % (HB₁) de la muestra, insoluble a pH 5, debería ser reclasificada como HA, mientras que un 36,6 % de la misma (HB₄), soluble en etanol 75 %, correspondería a la HC. Estos resultados remarcan lo indicado en la discusión sobre las "hemicelulosas aisladas" respecto de la irreproducibilidad de los valores obtenidos en el fraccionamiento de las hemicelulosas en HA y HB.

Al ser hidrolizadas todas las fracciones dieron productos similares a los obtenidos con la HB original aun cuando se notó en HB₃ una mayor proporción de hexosas y ácido galacturónico. Esta fracción fue analizada con la ultracentrífuga a cuatro concentraciones distintas, obteniéndose en todos los casos picos únicos con valores del coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) de: 1,63 S (c 0,35), 1,47 S (c 0,5), 1,48 S (c 0,7) y 1,39 S (c 1,0) (Figura 32). La extrapolación a dilución infinita dio un $S_{20,w}^0$ de $1,8 \times 10^{-13}$. Debe destacarse la poca variación de los coeficientes con la concentración ya que variando la concentración en un factor de 3 dicho coeficiente sólo varía en un 15 % (cerca al error del método). Este comportamiento sugirió la presencia de estructuras ramificadas. Por otra parte cabe recalcar que cuando la fracción HB₄ (ver más arriba) fue sometida a la ultracentrifugación no se detectó la formación de ningún pico, comportamiento coincidente con el de HC (ver Hemicelulosa C, pág.136) y que fue explicada en ambos casos por el bajo peso molecular de los componentes.

La Tabla 40 muestra asimismo que todas las fracciones contienen proteínas en porcentajes que varían del 11,9 % (HB₁) al 71,9 % (HB₂) sin seguir una secuencia definida. Los poderes rotatorios negativos indicaron un predominio de la configuración α -D, resultado coincidente con el obtenido por la precipitación con iodo que se discute a continuación.

Gaillard (1961) encontró que es posible separar los heteroxilanos y glucanos lineales de los polímeros ramificados de la HB, por solución de la mezcla en una solución concentrada de cloruro de calcio y precipitación de los polímeros lineales con una solución de iodo-iodato.

duro de potasio. Los polímeros ramificados se recuperan del sobrenadante.

Cuando HB fue suspendida en una solución concentrada de cloruro de calcio, quedó un residuo insoluble (HB_1) que se separó, y al agregar al sobrenadante la solución de iodo se formó rápidamente un precipitado marrón oscuro constituido (Tabla 41) por el 17 a 27 % del material recuperado, mientras que el restante 79 a 83 % permaneció en solución. Debe hacerse notar que el 53 % del producto disuelto no fue recuperado ya que se perdió por pasaje a través de la bolsa de diálisis (ver Parte Experimental, pág. 204). Esta pérdida por diálisis de un material previamente dializado durante 6 días es una constante que se repite a lo largo de todo el trabajo (ver Hemicelulosa C, pág. 135). En este caso es probable que el cloruro de calcio haya ejercido no sólo una acción específica en la formación del precipitado con iodo (Gould y col., 1971; Gaillard y Bailey, 1966; ver más adelante), sino que también, a través del elevado aumento de la fuerza iónica del medio, haya producido una apertura de los agregados moleculares formados por fragmentos del soluto de bajo peso molecular, facilitando así su diálisis.

Como es sabido los precipitados con iodo se producen con polisacáridos lineales o poco ramificados que tengan secuencias de por lo menos tres residuos de glucosa, glucosamina, manosa o xilosa unidos β -(1 \rightarrow 4)- (Gaillard y Bailey, 1966; Gaillard y col., 1969). En nuestro caso se produjo un precipitado marrón y no azul, fenómeno que ha sido observado a menudo en otros polisacáridos (Gaillard y Bailey, 1966), y teniendo en cuenta los complejos de iodo con amilosa y dextrinas, podría ser adjudicado a la presencia de cadenas cortas. En este sentido se conoce que las celodextrinas de grado de polimerización 2 a 6, maltodextrinas de grado de polimerización 2 a 8 y las β -(1 \rightarrow 4)-xilodextrinas de grado de polimerización 2 a 4 no reaccionan, mientras que las β -(1 \rightarrow 4)-xilodextrinas de grado de polimerización 5 ó 6 dan precipitado marrón.

Por similitud con la estructura del complejo de iodo con amilosa, se ha tratado de explicar (Gaillard y col., 1969) la estructura del precipitado suponiendo la existencia de interacciones dipolares entre los grupos hidroxilos, iodo, ioduro y posiblemente también el calcio si el polisacárido con uniones β -(1 \rightarrow 4)- pudiera disponerse en forma helicoidal. Conociendo las propiedades conformacionales de las series β -, es más probable un mecanismo en el que, por complejamiento entre los iones divalentes y los grupos hidroxilos de varias moléculas de polisacáridos, se forme una estructura tubular capaz de contener las secuencias de átomos de iodo. La débil estabilidad química de es-

tos complejos es consistente con cualquiera de las dos suposiciones.

Gould y col. (1971) propusieron un mecanismo más verosímil que tiene en cuenta las propiedades conformacionales de los polisacáridos de la serie β -(1 \rightarrow 4)- y su conocida tendencia a la agregación. Supone que las cadenas extendidas del polisacárido se apilan con las superficies apolares en contacto y los iones o moléculas pequeñas formarían capas entre las mismas; el color se desarrolla por interacción entre las moléculas de yodo y quizás también de los aniones dentro de esas capas. En este modelo la presencia de proteína podría producir la inhibición, no en función de su porcentaje, sino de su posición y forma de manera tal de alterar la formación del complejo.

El análisis de las fracciones complejables (HB_{li}) y no complejables (HB_{ri}) indicado en las Tablas 41 y 42, muestra que ambas fracciones contienen los mismos azúcares y están acompañadas de proteína, aunque contrariamente a lo esperado, el contenido de ésta es mayor en el producto precipitable.

De los cuatro monosacáridos que pueden ser responsables de la formación del complejo (glucosa, glucosamina, manosa o xilosa), el primero se encuentra en porcentajes muy pequeños, la manosa y la xilosa aparecen en proporciones aproximadamente del doble en el producto soluble y solamente la glucosamina está en mayor proporción en el producto precipitable.

Por otra parte, si se compara la composición de las fracciones "lineales" y "ramificadas" con sus equivalentes extraídas de otros órganos vegetales de leguminosas (Gaillard, 1965), se encuentran diferencias notables ya que la hemicelulosa B lineal de tallos de Trifolium pratense, Medicago sativa y Glycine max parecería estar compuesta por la mezcla de un glucano y un arabinoxilano, y la ramificada contiene cantidades notables de arabinosa, galactosa y ácido urónico, y menor proporción de xilosa. En nuestro caso la fracción lineal está compuesta por un 57,1 % de arabinosa y xilosa y contiene, a diferencia de los casos antes citados, más arabinosa que xilosa junto con porcentajes considerables (7,3 a 9,1 % c/u) de fucosa, manosa, galactosa, ácido galacturónico y glucosamina. La fracción ramificada contiene cinco azúcares en proporciones importantes: arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y ácido galacturónico (90,3 % del total) y menores proporciones de glucosamina, glucosa y fucosa. Es de notar que ambas fracciones muestran una composición cualitativamente similar y sometidas a la ultracentrifugación, dieron picos únicos y coeficientes de sedimentación de 1,39 y $1,24 \times 10^{-13}$ respectivamente (c 0,8), lo que indicó un tamaño molecular del mismo orden y próximo al de HB₃. En cambio la fracción insoluble

ble en la solución concentrada de cloruro de calcio (HB_1) mostró una composición tanto en hidratos de carbono como en aminoácidos muy diferentes de las lineales y ramificadas: el polisacárido es estructuralmente interpretable como un fucoarabano, idéntico al aislado por fraccionamiento de la hemicelulosa C (ver HC_1 , Tabla 48), con una relación molar arabinosa: fucosa de 5,6:1, aunque en este caso por contener una menor proporción, salvo glucosamina, de los demás monosacáridos (12,3% frente al 25,9 % en HC_1) resulta mejor definido; la proteína asociada a la misma es del tipo de la encontrada para las hemicelulosas A y C.

Nuestros resultados, en general, concuerdan más con los obtenidos por Monro y col. (1976) con hipocotilos de Lupinus angustifolius. La hemicelulosa B se fraccionó en un polisacárido lineal con uniones (1→4)- y un heteroglicano B altamente ramificado; el análisis mostró que el polisacárido precipitado con iodo estaba formado por dos fracciones, una dispersa pero no disuelta en cloruro de calcio y otra fracción soluble en ese medio. La composición en monosacáridos de la fracción lineal "total", a pesar de contener cantidades significativas de galactosa, es diferente de la encontrada para pastos y legumbres (Gaillard, 1965) que mencionáramos antes: el 88 % del total de los monosacáridos es arabinosa. Estas diferencias fueron explicadas considerando que los hipocotilos contienen principalmente pared primaria, mientras que en los casos citados, existe un alto grado de engrosamiento secundario (ver Paredes celulares de vegetales superiores, pág. 30). Consideraciones análogas pueden también ser hechas en nuestro caso. La hemicelulosa B ramificada de Lupinus angustifolius presenta una composición similar a la de otros vegetales, con excepción de la manosa que proviene del polisacárido estrechamente asociado con las microfibrillas de celulosa. Estos polímeros de manosa requieren por lo general tratamientos con hidróxido de potasio 24 % para poder ser extraídos (Monro y col., 1975; Gaillard y Bailey, 1968) y con todo algo de manosa permanece en la fracción celulósica insoluble. A este respecto cabe recordar que en nuestro caso la extracción acuosa previa a la aloalina no eliminó el manano o los galactomananos de menor contenido en galactosa (ver Polisacáridos solubles en agua, pág. 101). También para esta fracción sobresalen los altos porcentajes de arabinosa y la casi ausencia de galactosa. En cuanto a la parte de la fracción lineal insoluble en cloruro de calcio, está enriquecida en galactosa y arabinosa y su insolubilidad sería debida, al menos parcialmente, a la interacción de los polímeros en solución ya que la presencia de urea 7 M en la solución de cloruro de calcio previene tal separación.

Finalmente, si bien la separación ha producido en nuestro caso fracciones de diferente composición cuantitativa, la comparación con las de las hemicelulosas A y C y las obtenidas a partir de las mismas, sugiere que no estamos en presencia de un fraccionamiento neto entre los polímeros lineales y ramificados, sino que han precipitado aquellas moléculas enriquecidas en estructuras adecuadas para una inter-relación con el yodo. De acuerdo con el análisis presentado anteriormente, la estructura responsable de la precipitación serían las cadenas de glucosamina que tendrían uniones β -(1 \rightarrow 4)-. En este sentido, puede recordarse que en el fraccionamiento de la hemicelulosa A en medio alcalino, la solubilidad resultó inversamente proporcional al contenido en glucosamina (Figura 24, A). Además si lo indicado es cierto, las cadenas de glucosamina aunque no pueden ser demasiado largas por el color del precipitado, tampoco pueden ser menores de 4 ó 5 unidades.

H E M I C E L U L O S A C

El procedimiento de diálisis aplicado para neutralizar los extractos alcalinos de las hemicelulosas posibilitó, como ya se indicara, el estudio de la fracción de hemicelulosa C "no dializable" de las semillas de Gleditsia triacanthos.

Las propiedades de esta hemicelulosa C (Tabla 44) mostraron claras diferencias con las obtenidas de otras especies. Así por ejemplo, la HC de pastos de Panicum maximum y Heteropogon contortus y de las variaciones Q57 y Q63 de caña de azúcar (Blake y col., 1971), en las que la neutralización con ácido acético se reemplazó por el uso de resinas, posee un bajo contenido en hidratos de carbono (2 %) y alto en cenizas (40 %), debido a la sílica presente y extraída por el álcali) y es en su mayor parte de bajo peso molecular y por lo tanto dializable (Blake y Richards, 1970). El único caso, hasta donde llega nuestro conocimiento, de hemicelulosa C de semillas de leguminosas estudiada es el de Stylosanthes humilis (Pang Way y Richards, 1971). Esta semilla difiere de otras leguminosas estudiadas previamente, en que no posee polisacáridos extraíbles con agua (galactomananos o glucanos) sino abundante material proteico junto con glicósidos y oligosacáridos; el análisis de la hemicelulosa C mostró que es predominantemente de naturaleza proteica (67 %) y presenta un bajo contenido en hidratos de carbono (menor 5 %) y alto en cenizas. En cambio, la hemicelulosa C de Gleditsia triacanthos estudiada en nuestro caso, mostró un alto contenido en hidratos de carbono (46 %) y bajo en cenizas (3 %) junto con

abundante material nitrogenado atribuido, al igual que en las demás fracciones, al contenido en proteínas de la misma (53 %).

Como la hemicelulosa C se obtuvo de la solución remanente de precipitar la hemicelulosa B con etanol, los productos que la componen son solubles en etanol 75 %. Esta solubilidad puede deberse a su composición o a su peso molecular.

Cuando la composición en monosacáridos se compara con la de la hemicelulosa A o la hemicelulosa B (Tabla 27) se ve que, dentro de las variaciones observadas en los distintos fraccionamientos, las fracciones son semejantes y al igual que la fracción U presenta en la parte de hidratos de carbono un bajo contenido en ácido galacturónico (4,5%) y por lo tanto una baja contaminación con pectinas. Por otra parte, la composición en aminoácidos es semejante a la de la hemicelulosa A y, salvo en lo que respecta a los porcentajes de ácido glutámico y arginina, a la de la hemicelulosa B (Tabla 28).

El hecho de que los productos componentes de HC pasen a través de las membranas de diálisis, incluso las que han sido modificadas para reducir el tamaño del poro (ver Apéndice, pág. 212), y que, según lo observado en las determinaciones de velocidad de sedimentación con la ultracentrífuga, tienen constantes de difusión lo suficientemente altas como para impedir la formación de superficies de discontinuidad aún a campos centrífugos de 200.000 g, parecería indicar que sus pesos moleculares, y por lo tanto sus tamaños, son bajos.

La razón de que, siendo estos fragmentos dializables, no se hayan perdido durante la prolongada etapa de neutralización de los extractos aloalinos, debe ser buscada en las siguientes consideraciones: (a) de los estudios de Craig y King (1962) es evidente que la diálisis, al igual que la cromatografía sobre geles, es un efecto de tamices moleculares, y que la velocidad de diálisis de un soluto en particular depende de numerosos factores (la relación entre el área de la membrana y el volumen de solución a dializar, la naturaleza de la membrana (espesor y porosidad), la temperatura, el efecto del solvente en el soluto y en la membrana (se utilizaron soluciones de cloruro de sodio 0,1 M y de hidróxido de potasio 10 %, ver Apéndice, pág. 212, la viscosidad del solvente y el efecto de las cargas) que no permiten hacer comparaciones válidas del comportamiento en las diálisis, en especial cuando los productos han sido purificados como consecuencia del fraccionamiento (ver más adelante); y (b) la fuerte tendencia a la agregación que muestran estos productos y que, de acuerdo con lo comentado anteriormente, explicaría la presencia de estos compuestos de menor peso molecular en las fracciones no dializables, por estar en contacto con molé

oulas mayores (que luego fueron separadas como hemicelulosas A y B), y que además limita la utilidad de la cromatografía sobre geles para la determinación de los pesos moleculares de los mismos.

Esta asociación aclararía también el hecho de que la electroforesis sobre gel de poliacrilamida de una sola banda, aunque, como se trata de fragmentos pequeños, no se descarta la posibilidad de que el tamaño del poro del gel haya sido demasiado grande como para permitir una resolución adecuada como tamiz molecular (Davis, 1964).

El control de la homogeneidad por cromatografía sobre geles de distintas mallas condujo, luego de un trabajoso fraccionamiento, al aislamiento de cinco fracciones distintas, aparentemente homogéneas (ver Fraccionamiento de HC. Propiedades de las fracciones, pág. 88). Es interesante destacar que todas estas fracciones están formadas por hidratos de carbono y proteínas, componentes que no pudieron ser separados por cromatografía sobre Sephadex, y por lo tanto, la superposición de los picos determinados por el análisis de los hidratos de carbono y las proteínas, sugeriría que ambos componentes deben estar "unidos" entre sí. Por otra parte, dado que las fracciones fueron eluidas en la recromatografía sobre Sephadex G-100 en el mismo volumen en que lo fueran originariamente, el tamaño molecular o las propiedades de adsorción, o ambas, son características para cada fracción y no reflejan interacciones moleculares de los compuestos entre sí.

Una de las fracciones (HC₁) mostró un peso molecular lo suficientemente alto como para poder estudiarse con la ultracentrífuga (Figura 45). Las determinaciones indicaron la presencia de un único pico y se obtuvieron, a dos concentraciones muy diferentes (0,4 % y 0,8 %), coeficientes similares entre sí, lo que sugeriría una estructura ramificada. El hecho de que el pico correspondiente a este fragmento no haya aparecido en la ultracentrifugación de HC, puede atribuirse a su baja contribución al total de la muestra.

La proteólisis de HC con pronasa dio un producto cuyo porcentaje de proteína era el 81,1 % del porcentaje original. Es evidente que la acción de la enzima fue muy limitada, lo que podría explicarse por el impedimento de las cadenas de hidratos de carbono unidas a la proteína; este tipo de efecto es usual y cuando un grupo de hidratos de carbono interfieren con el modo normal de acción de algunas enzimas proteolíticas, se obtienen péptidos de mayor tamaño (Lee y Montgomery,

1962; Fletcher y col., 1963). Es posible que en algunos fragmentos menos impedidos la hidrólisis haya sido mayor, conduciendo a productos que se perdieron durante la diálisis (compárese, por ejemplo, la composición en monosacáridos de fracciones equivalentes antes y después de la hidrólisis enzimática, Tabla 48). El diagrama de elución sobre Sephadex G-100 del producto resultante de la proteólisis (Figura 35) mostró una distribución de los componentes idéntica a la del original (Figura 38), lo que confirmó que este tratamiento no introdujo modificaciones fundamentales.

Del análisis de la composición en monosacáridos de las fracciones separadas por cromatografía sobre Sephadex de este producto (HC_{p2} y HC_{p4}), y de las cinco fracciones aisladas en las cromatografías del producto original (Tabla 48), puede verse que las mismas comienzan a definirse en términos estructuralmente interpretables. Así por ejemplo: (a) la fracción HC_{3-2c} se presenta como un arabano; (b) HC_1 es rica en un fucoarabano; (c) HC_{3-1} es básicamente un fragmento de galactomanano estrechamente relacionado, aunque de mucho menor peso molecular, con el aislado del endosperma, ya que la relación molar Man:Gal de 2,7 es del orden de la encontrada en ese caso (Tabla 21) y la relación molar Man+Gal:GluN de 20,1 es consistente con el mayor contenido en proteína de este fragmento (43 %) comparada con el del galactomanano del endosperma de igual relación molar (G_{mt} , 11 %); (d) la fracción HC_{3-2a} , aunque contiene todos los otros azúcares presentes en la fracción original (Tabla 48), es rica también en un galactomanano de menor contenido en galactosa (relación molar Man:Gal 3,3). A este respecto cabe recordar (ver Polisacáridos solubles en agua, pág. 101) que, luego de la extracción acuosa a temperatura ambiente y a 50 C, queda en el remanente un galactomanano insoluble de menor contenido en galactosa (relación molar 3,9-4,3); (e) consistentemente con lo indicado en (c) y (d) se observa que las proteínas asociadas con dichas fracciones (HC_{3-1} y HC_{3-2a} , Tabla 49) son prácticamente idénticas a las que se detectaron junto con los galactomananos del endosperma (Tabla 22); (f) la fracción HC_{p4} , resultante del tratamiento con pronasa, es notablemente similar en su composición cuali y cuantitativa al fragmento de menor peso molecular (fracción HC_{3-2d} , Figura 51) obtenido a partir de la HC original, aunque como ambas fracciones no son estructuralmente las mejor definidas, es posible que representen a la "mezcla" de las unidades de polisacáridos que forman parte de los puntos de unión o de asociación en la estructura molecular total (ver más adelante).

Siguiendo el mismo razonamiento adoptado para la discusión de la hemicelulosa A, recordemos que para visualizar la importancia relativa de los componentes y obtener, por lo tanto, las posibles estructuras, la composición porcentual molar (Tabla 48) puede no ser la mejor forma de expresar los datos obtenidos. En efecto, considerándolas en forma absoluta conducen a pesos moleculares para la parte de hidratos de carbono, a los que hay que sumar la parte proteica, muy superiores a los que por sus propiedades deben tener los fragmentos estudiados (nótese, por ejemplo, el comportamiento de las fracciones HC₃-2a,b y c que pasan a través de la columna de Sephadex G-15 con volúmenes de elución (Figura 51) que aunque distantes del volumen de inclusión de la columna (305 ml), muestran claramente que las mismas son retenidas en la red del gel).

Cuando se calculó la relación molar mínima, dividiendo todos los valores de los monosacáridos de cada fracción por el menor (Tabla 52) se obtuvo un panorama más real de las relaciones entre los componentes, junto con pesos moleculares del orden de los esperados. El he-

Tabla 52. Relación molar mínima de los monosacáridos componentes de las fracciones obtenidas por fraccionamiento y desproteínización de HC.

Monosacárido	HC ₁	HC _{p2}	HC ₃₋₁	HC _{3-2a}	HC _{3-2c}	HC _{3-2d}	HC _{p4}
Arabinosa	19,3	23,1	1,5	4,4	71,6	2,0	3,2
Fucosa	3,4	1,1	0	4,1	0	1,0	1,6
Xilosa	2,1	5,2	1,0	5,9	2,4	2,2	3,2
Manosa	1,3	1,0	22,4	20,9	1,7	1,4	1,7
Galactosa	1,1	0	8,4	6,4	0	0	1,0
Glucosa	1,0	7,4	0	1,0	0	1,4	2,2
Acido galacturónico	2,9	0	1,0	7,0	0	0	0
Acido glucurónico	0	0	0	0	0	1,0	1,2
Glucosamina	1,2	1,9	1,5	5,8	1,0	3,2	5,5

cho de que los monosacáridos componentes no se encuentren en relación estequiométrica, debe ser explicado en base a las siguientes observaciones: (a) las fracciones no pueden ser consideradas como monodispersas sino que representan un grupo de moléculas extremadamente similares que contienen las mismas unidades de hidratos de carbono, pero que difieren ligeramente en la longitud y composición de las cadenas; (b) el procedimiento de cálculo es arbitrario en cuanto a la elección del componente menor, ya que es bastante probable que los azúcares que figuran en las proporciones menores, no estén presentes en todas las moléculas dentro de la misma fracción; (c) las pequeñas diferencias en la composición producidas como consecuencia de los errores inherentes a los métodos analíticos empleados y/o la microheterogeneidad antes señalada.

Teniendo en cuenta que la mezcla de compuestos que forman la hemicelulosa C proviene de la degradación de las moléculas mayores (hemicelulosas A y B) o a lo sumo de fragmentos comunes, la importancia del estudio de la misma radica en la posibilidad de utilizar los resultados obtenidos con estas fracciones aisladas para elaborar conclusiones respecto de la estructura de los fragmentos mayores.

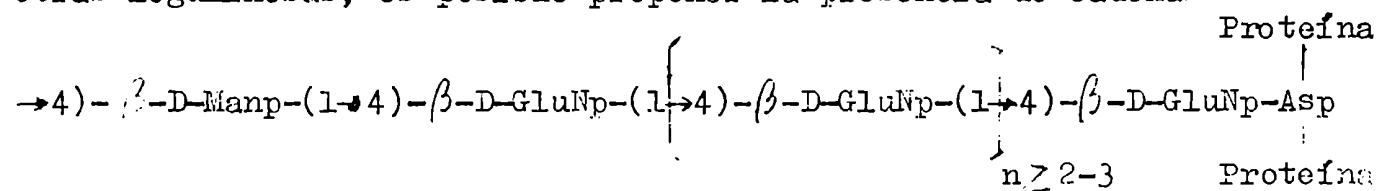
A continuación se detallan los principales rasgos estructurales encontrados en este trabajo que permitieron, dentro de las limitaciones impuestas por la complejidad del problema, y por relación con los resultados derivados de trabajos previos con este tipo de productos que se enunciaran a lo largo de la presentación y la discusión, proponer estructuras tentativas para los principales fragmentos.

Como punto de partida es posible proponer la existencia de un "core" de proteínas al cual están unidas las cadenas de polisacáridos. La resistencia de esta proteína del "core" a las enzimas proteolíticas sería consistente con el efecto de protección que sobre el ataque enzimático produce el polisacárido, y la retención de material proteico en los productos de degradación por hidrólisis ácida parcial y/u oxidación con periodato de la hemicelulosa A, confirmaría la existencia de la unión polisacárido-proteína del core. La proteína presenta una considerable proporción de ácido aspártico y la glucosamina detectada estaría unida (ver Naturaleza del enlace polisacárido-proteína, pág. 143) a la asparagina ubicada a lo largo de la cadena peptídica en la que ese tipo de unión está presente. A través principalmente de este tipo de enlace, estarían unidos covalentemente los polisacáridos, pudiendo existir además asociaciones (agregaciones) entre los mismos y/o las proteínas.

Estas suposiciones son consistentes con la tendencia actual de que en las células vegetales los polisacáridos raramente se encuentran en estado puro, sino combinados o asociados con las proteínas.

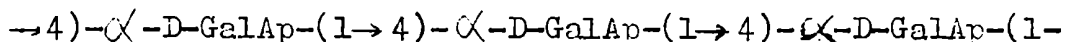
La composición en aminoácidos de la proteína del core indicó que ésta puede ser clasificada como una proteína de reserva (ver pág. 15).

Como resultado de comparar la información obtenida en nuestro caso con los estudios efectuados sobre glicoproteínas de semillas de otras leguminosas, es posible proponer la presencia de cadenas



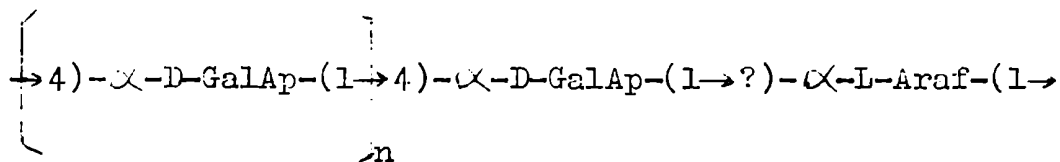
y un enlace N-glicosídico entre la glucosamina y la asparagina.

El ácido galacturónico, junto con la arabinosa y la galactosa, son los monosacáridos componentes de las sustancias pécticas aisladas. Los estudios de oxidación con periodato de la hemicelulosa A y de la hemicelulosa A degradada por hidrólisis ácida parcial, son consistentes con la estructura encontrada para las pectinas de semillas de leguminosas, esto es cadenas

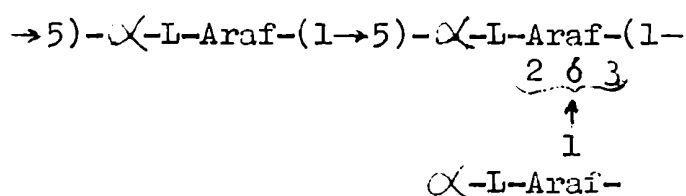


sustituídas (1 cada 2 ó 3 unidades) por cadenas laterales. Respecto de esta ramificación, la alta proporción de arabinosa presente en las sustancias pécticas estaría a favor de una sustitución por unidades arabinofuranosílicas simples, aunque no se descarta la posible sustitución por unidades de xilosa, como en las pectinas de harina de soya, con una relación molar GalA:Xil de 3 en HA y de 7 en P. Ambas suposiciones están de acuerdo con los mayores porcentajes de arabinosa y xilosa degradados como terminales de cadena en la oxidación incompleta con periodato.

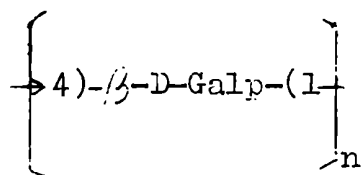
Asimismo, la liberación del 61 % del ácido galacturónico total de la HA por hidrólisis ácida parcial en condiciones específicas para la ruptura de las uniones furanósicas, la diferencia en la velocidad de hidrólisis y la producción de oligosacáridos formados por ácido galacturónico y arabinosa, correspondería a la presencia en el polisacárido original de cadenas



Respecto de los restantes polisacáridos pécticos, tenemos por una parte que la relación Ara:GalA en la hemicelulosa A y en la fracción P (1,5), la identificación de un fucoarabano en la resolución de los productos componentes de la hemicelulosa C (fracción HC₁) y de la hemicelulosa B (fracción HB₁) de igual relación molar Ara:Fuc (5,6) y algo superior en una fracción de la hemicelulosa A (HA₂₀, 6,8), la constancia de dicha relación molar en los productos crudos (16 en U, 14 en P y 12 en HA) y en el fragmento liberado por hidrólisis ácida parcial de HA (12), la identificación de un arabano de bajo peso molecular en la hemicelulosa C (fracción HC₃₋₂₀), y los estudios de degradación de la hemicelulosa A por hidrólisis ácida parcial y oxidación con periodato, sugirieron que una gran parte del polisacárido está for



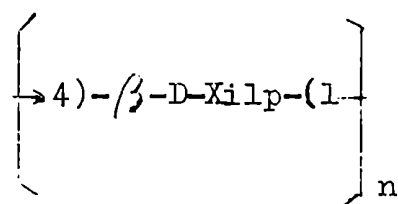
Por otra parte, si bien la galactosa detectada en los hidrolizados proviene del galactomanano resistente a las extracciones acuosas previas y aislado en las restantes fracciones como consecuencia de un tratamiento más energético, el contenido en galactosa de ese galactomanano es bajo (18 a 20 %) y aún asumiendo que la presencia de fragmentos del galactomanano aislado en las extracciones acuosas como el identificado en la fracción HC₃₋₁, el porcentaje de galactosa de una serie de fracciones (HA₂₀, HB₁₁, HC₁ y HC_{p4}) excede notablemente los valores esperados en función de esas relaciones molares, y podría ser asignado en principio a la existencia, aunque en baja proporción, de galactanos del tipo de los informados para las sustancias pécticas.



siendo precisamente en la fracción U, estructuralmente la mejor definida, donde se observan los mayores porcentajes de galactosa (relación molar Ara:Gal de 6,6). Las determinaciones estructurales efectuadas con anterioridad a este trabajo sobre el galactomanano extraído directamente con agua a 50 C, mostraron que un pequeño número de unidades de (1→4)-D-galactosa pueden estar formando parte de la cadena lateral del galactomanano. Los estudios efectuados en nuestro caso por oxidación con periodato son consistentes con la baja proporción de galactosa como extremo terminal (galactosa del galactomanano) y con la presencia de esas cadenas lineales. Además, la liberación de fragmentos de las sustancias pécticas por hidrólisis ácida parcial formados por arabinosa, galactosa y ácido galacturónico en relación molar 2:1:1, sugeriría que parte de la galactosa está unida a la cadena principal del galacturonano.

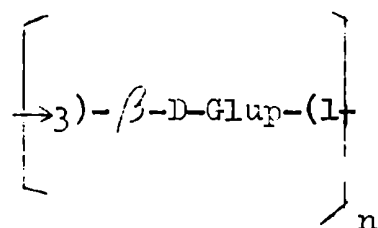
Finalmente, las cantidades de los restantes azúcares neutros, xilosa y glucosa, que son típicos componentes de los polisacáridos hemicelulósicos, sólo son significativas para la xilosa en las fracciones U, HB y HC que coincidentemente son las que presentan los menores porcentajes de ácido galacturónico (prácticamente despreciables en U y

HC) e indicaría la presencia de cadenas



lo que explicaría entonces los valores del xilano extraído con la solución de urea por un lado, y los resultados obtenidos por oxidación con periodato, por otro.

Estos estudios sugirieron asimismo que la glucosa formaría cadenas del tipo



y aunque la falta de una relación molar definitoria entre este monosacárido y cualquiera de los restantes no permite establecer posibles interrelaciones (por ejemplo, no existe una relación molar constante a lo largo de los distintos productos para la xilosa y la glucosa lo que hace poco probable la existencia de un xiloglucano como el encontrado en las hemicelulosas de otras fuentes), la retención del material proteico luego de la oxidación con periodato junto con la cadena del glucano intacta indicaría alguna forma de unión entre éste y el core de proteína.

Las proporciones de estos dos polisacáridos resultaron notablemente incrementadas por eliminación de los restantes fragmentos luego de procesos degradativos como la hidrólisis proteolítica (fracciones HC_{p2} y HC_{p4}), la hidrólisis ácida parcial (fracción a) o la oxidación con periodato (fracciones HA y a).

En todos los casos, los resultados obtenidos a través de los distintos análisis indicaría que los fragmentos son esencialmente lineales, en promedio cortos, y unidos entre sí mediante distintos tipos de entrecruzamientos que confieren al sistema total las características propias de una "malla".

N A T U R A L E Z A D E L E N L A C E P O L I S A C A R I D O - P R O T E I N A

Las fracciones aisladas por los distintos procedimientos de extracción mostraron (Tabla 27) un contenido en proteínas variable (25 a

60 %). De la composición en aminoácidos (Tabla 28) sobresalen los porcentajes de aminoácidos dicarboxílicos (ácidos glutámico y aspártico) y básicos (principalmente lisina y arginina) y de leucina. Estas propiedades caracterizan, según se comentara al tratar los polisacáridos solubles en agua, a las proteínas de reserva de las leguminosas (ver Proteínas de semillas de leguminosas, pág. 15). Por otra parte, la no detección de porcentajes significativos de hidroxiprolina en las fracciones extraídas, confirmaría que no se trata de proteínas estructurales (ver Proteínas estructurales, pág. 17).

Merece destacarse que los procedimientos de extracción utilizados cubren un amplio rango de posibilidades en lo que a extracción de polisacáridos se refiere (desde la extracción con agua a temperatura ambiente y a 50 C, la extracción suave con oxalato de amonio, hasta la extracción en condiciones más drásticas como lo es el álcali 10 %, e incluso el empleo de un solvente con propiedades disociantes (urea 7 %)) y sin embargo los porcentajes de proteína extraída en cada caso y la distribución en la composición cuali y cuantitativa en aminoácidos no muestran diferencias notables. Este hecho se mantuvo también al someter las fracciones aisladas a procedimientos de fraccionamiento de complejidad variable como la precipitación fraccionada con etanol del galactomanano extraído a temperatura ambiente (Tabla 23), la disolución fraccionada de la hemicelulosa A con soluciones de hidróxido de potasio de concentración creciente (Tabla 33), el fraccionamiento de la hemicelulosa B por precipitación con iodo en presencia de cloruro de calcio (Tabla 41, en este último caso pudo observarse en dos de las subfracciones un notable incremento en el contenido en ácido glutámico y arginina, con la permanencia de los valores encontrados para la relación a/b en las demás fracciones), y finalmente el uso de la cromatografía sobre geles de distintas mallas para separar los productos componentes de la hemicelulosa C (Tabla 48) y de los productos obtenidos por digestión enzimática (proteolítica) de la misma. Además se observó la retención del material de naturaleza proteica en los productos de degradación por hidrólisis ácida parcial y/u oxidación con periodato de la hemicelulosa A, y la resistencia a la proteólisis de los productos componentes de HC.

En consecuencia, si bien nuestros estudios no presentan una prueba concluyente de la existencia de un enlace covalente entre el polisacárido y la proteína, permiten concluir que estos componentes deben estar unidos entre sí más "firmemente" que por una simple asociación ya que ninguna de las técnicas no hidrolíticas usadas permitieron separar el polisacárido de la proteína. Resultados de esta natura-

leza han sido encontrados en proteínas (glicoproteínas) de semillas de otra leguminosa: Phaseolus vulgaris (Pusztai, 1964).

Al estudiar la composición en monosacáridos de las fracciones aisladas y las obtenidas a partir de las mismas por los distintos métodos de fraccionamiento, se encontró la presencia de un aminoazúcar, la glucosamina, que no es un componente usual del tipo de polisacáridos estudiado (ver Polisacáridos insolubles en agua, pág. 106).

Si bien la presencia de este aminoazúcar aparece asociada con el contenido en proteínas "unidas" al polisacárido (Tabla 27), los porcentajes de glucosamina y proteínas no guardan una relación directa y, más aún, en ciertos casos (fracciones G_{m30} , HA₂₀) los valores de glucosamina detectados justifican el porcentaje de nitrógeno total dosado, lo que implicaría la ausencia de proteínas.

Llama también la atención a este respecto los elevados porcentajes detectados para este aminoazúcar en los residuos de la semilla luego de la extracción consecutiva con agua y con álcali (fracción S_H , 16,8 %) o con agua, álcali y oxalato de amonio sucesivamente (fracción S_{hp} , 20,5 %), y en los que no se observaron porcentajes significativos de proteínas (Tabla 27). Por otra parte entre los productos crudos (Tabla 27), los mayores porcentajes de este aminoazúcar se extrajeron precisamente cuando se empleó el álcali que, como se sabe, produce degradaciones de distinto tipo (ver Efectos de la extracción en medio alcalino, pág. 48) entre ellas la de la cadena peptídica.

Proteínas que contienen glucosamina han sido encontradas en una gran variedad de vegetales y en general la presencia de glucosamina junto con otros azúcares neutros, en especial manosa, es una de las características de las glicoproteínas de reserva de las semillas de leguminosas (ver Proteínas que no pertenecen a las paredes celulares, pág. 23). De hecho, las fracciones proteicas aisladas en nuestro caso presentan las características de las proteínas de reserva de las leguminosas.

De los tres tipos de uniones polisacárido-proteína (ver Naturaleza del enlace hidrato de carbono-proteína, pág. 27) fue posible descartar: (a) la existencia de uniones O-glicosídicas entre la arabinosa y el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina en los productos extraídos, en razón de la no detección de este último aminoácido (sólo se observó su presencia en un residuo de extracción, fracción S_H) y que en líneas

generales, la composición en aminoácidos de la proteína es distinta de la encontrada para glicoproteínas estructurales (Tabla 15), y (b) uniones O-glicosídicas entre el azúcar y el grupo hidroxilo de la serina y/o treonina, en razón de la marcada estabilidad al álcali del enlace polisacárido-proteína, la no detección de los productos de β -eliminación correspondientes (ver Determinación de las uniones O-glicosídicas a serina y/o treonina, pág. 98), y la similitud en los porcentajes para estos dos aminoácidos en las fracciones extraídas en medio alcalino (H) comparadas con las extraídas en medio neutro (U y P).

En consecuencia, el análisis de los resultados obtenidos, esto es los porcentajes de glucosamina y ácido aspártico determinados en las fracciones, la estabilidad de la unión polisacárido-proteína luego de varios tratamientos, en especial en medio alcalino, y la ausencia de otro tipo de uniones, estaría a favor de la existencia de una unión entre el polisacárido y la proteína que involucre a estos compuestos, es decir, un enlace glucosilamina con la asparagina. Este tipo de enlace ha sido encontrado (Lis y col., 1966 a) en una glicoproteína de leguminosas bien caracterizada, la hemoglutina de harina de soya (ver Glicoproteínas que no pertenecen a las paredes celulares, pág. 23), y en general se considera que en este tipo de compuestos, en los que además siempre se encuentra presente la glucosamina (Tabla 16), el ácido aspártico es el aminoácido principalmente involucrado en las uniones hidrato de carbono-proteína.

C O N C L U S I O N

La mayoría de los resultados presentados deben ser considerados no sólo dependientes del tipo de material empleado, sino también de los procedimientos utilizados para el aislamiento de las fracciones estudiadas.

Los resultados obtenidos en las primeras etapas del análisis indicaron la presencia de una compleja mezcla de productos, formados por polisacáridos con diferentes monosacáridos, unidos a través de varios tipos de enlaces glicosídicos y uniones no covalentes, y proteínas y/o glicoproteínas asociadas a los mismos.

Las extracciones efectuadas con los distintos solventes sobre el residuo remanente de agotar el material por extracción acuosa, condujeron a la obtención del mismo producto complejo o mezcla de productos estrechamente unidos, y las características del mismo derivaron del método de aislamiento empleado. Así en efecto, el producto mejor defi-

nido se obtuvo, aunque con el rendimiento más bajo, mediante la extracción no degradativa con un agente disociante (urea). En todos los casos, la hidrólisis dio, en adición con la galactosa y la manosa del galactomanano remanente, la mezcla de los azúcares típicos, principalmente, de las sustancias pécticas (ácido galacturónico, arabinosa y galactosa) junto con menores cantidades de fucosa, xilosa y ácido glucurónico, y los aminoácidos y la glucosamina propios de las proteínas y glicoproteínas de reserva de las leguminosas.

Los estudios tendientes a la caracterización más detallada de estos fragmentos, se llevaron a cabo sobre los productos resultantes de la extracción alcalina. La investigación se orientó de manera tal de obtener con todas las técnicas disponibles, aunque no una definición estructural completa del sistema de polisacáridos, una información quizás tanto o más importante mediante los distintos criterios de fraccionamiento en compuestos de complejidad variada, y de los estudios estructurales más limitados.

Estos estudios permitieron proponer estructuras tentativas para los polisacáridos componentes de las fracciones y estimar semicuantitativamente las proporciones relativas de los mismos en cada fracción. La Tabla 53 muestra el resumen de los resultados obtenidos y los recuadros indican los polisacáridos definitorios de cada fracción.

Los polisacáridos identificados fueron los siguientes:

- a) Galactomanano: por similitud con el galactomanano obtenido en las extracciones acuosas, este galactomanano consistiría en una cadena de β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranososa con cadenas laterales (1 cada 4 unidades, salvo las fracciones HC₃-1, 1 cada 2,7, y HC₃-2a, 1 cada 3,3) formadas por restos de α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranososa.
- b) Arabano: los datos indicaron la presencia de proporciones importantes de un fucoarabano (relación molar Ara:Fuc de 6, salvo para la fracción U que resultó ser de 16) con una estructura ramificada. Esta relación molar fue calculada de la composición de las fracciones identificadas como fucoarabanos y partir de dicha relación se determinó el porcentaje de arabinosa perteneciente al galacturonano.
- c) Galacturonano: consistiría en una cadena lineal de ácido D-galacturónico unido α -(1 \rightarrow 4)- que contiene unidades α -L-arabinofuranosílicas en la cadena principal y posiblemente también junto con restos β -D-xilopiranosídicos, en las cadenas laterales.
- d) Galactano: estaría formado por unidades de D-galactosa enlazadas β -(1 \rightarrow 4)- y su porcentaje fue calculado por diferencia a partir del porcentaje total considerando el contenido en galactosa del galactomanano presente.

- e) Xilano: los datos experimentales resultaron consistentes con las es-
tructuras encontradas para los xilanos hemicelulósicos, es decir ca-
denas lineales de β -D-xilopiranosas. El porcentaje del xilano fue
calculado para aquellas fracciones de contenido en ácido galacturóni-
co apreciable, descontando el porcentaje asignable al galacturonano
no (1 cada 2 ó 3 unidades de ácido galacturónico).
- f) Glucano: estaría constituido por una cadena de unidades β -(1→3)-D-
-glucopiranosas.
- g) Glucosamina: formaría el enlace glucosilamina con la asparagina de
la cadena peptídica y estaría presente en forma de oligosacáridos
de unidades β -(1→4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas.

Tabla 53. Composición de las fracciones aisladas de las semillas de *Gleditsia triacanthos*^a.

Componente	U	P	HA	HB ₁	HB _{1f}	HB _{1t}	HC ₁	HC ₃₋₁	HC _{3-2a}	HC _{3-2c}	HC _{3-2d}
Galactomanano	29	14	20	4	21	11	5	86	49		11
Arabano	34	21	20	83	37	52	70	4	15	93	25
Galacturonano	4	60	48	8	17	12	13	3	15		
Galactano	5	1	4	1	3	5	2				
Xilano	26				18	10	3	3	8	3	18
Glucano		2	3		2	2	3		2		11
Glucosamina	2	3	7	4	3	7	4	4	10	1	27
Proteína	24	25	29	41	33	76	20	43	39	ND	ND

^a Ver explicaciones en el texto.

Los valores indicados en la Tabla 53 para la proteína corres-
ponden a los porcentajes en peso y para los polisacáridos, a las pro-
porciones relativas calculadas a partir de la composición porcentual
molar de la parte de hidratos de carbono de las fracciones.

Los resultados indicaron que hay fragmentos estructuralmente
bien definidos, mientras que otros aparecerían como suma de fragmentos
distintos. Los componentes pueden no estar todos involucrados en la
misma estructura (macromolécula) pero existe bastante evidencia a fa-
vor de distintas formas de entrecruzamiento a través de enlaces cova-
lentes y fuerzas electrostáticas y/o uniones hidrógeno entre los polí-
meros.

En base a los datos experimentales y por comparación con resul-
tados informados sobre las estructuras de estas macromoléculas, fue po-
sible proponer la existencia de un core de proteína al cual estarían
unidas las cadenas de polisacáridos, y los principales puntos de unión

covalente podrían involucrar a los siguientes monosacáridos: (1) Man→GluN, (2) Gal→Man, (3) GalA→Ara, (4) Ara→Gal, (5) Ara→GalA, Xil→GalA y Gal→GalA, y (6) Glu→X-Proteína. Estas uniones representan algunas de las estructuras probables, ya que para un mismo azúcar es factible más de un tipo de unión.

Las cadenas de los polisacáridos componentes del sistema estarían formadas por fragmentos esencialmente lineales, en promedio cortos, y estarían unidos entre sí a través de distintos tipos de entrecruzamiento (uniones covalentes y no covalentes), lo que conferiría al sistema total las características de una malla. Presumiblemente, las fracciones que contienen los mismos monosacáridos pero en distintas proporciones, provendrían de los distintos modos de ruptura de la estructura intacta.

P A R T E E X P E R I M E N T A LT E C N I C A S G E N E R A L E S

El secado en desecador se hizo a presión reducida sobre cloruro de calcio, y en los casos indicados, sobre pentóxido de fósforo o hidróxido de sodio.

Las evaporaciones se realizaron a presión reducida en un evaporador rotatorio y a temperaturas del baño menores de 45°.

Los poderes rotatorios fueron medidos a temperatura ambiente (entre 20° y 25°) en un polarímetro O. C. Rudolph & Sons modelo 70, en un tubo de 2 dm, y en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141, en un tubo de 1 dm. Las rotaciones ópticas indicadas son valores finales. Los residuos insolubles observados en algunos casos (fundamentalmente productos brutos) se despreciaron en los cálculos de la concentración.

Las muestras para análisis y microanálisis fueron secadas sobre pentóxido de fósforo en alto vacío en una difusora de mercurio Leybold y a una temperatura de 50°.

Las extracciones se realizaron, salvo en los casos especificados, a temperatura ambiente y con agitación mecánica constante.

Las soluciones de álcali empleadas se burbujearon con nitrógeno inmediatamente antes de ser usadas y las extracciones correspondientes se llevaron a cabo bajo corriente de nitrógeno.

Los productos insolubles o los precipitados obtenidos por extracción y/o purificación de las distintas fracciones, se separaron por centrifugación, se lavaron por intercambio de solvente con etanol y luego éter, y se secaron a temperatura ambiente en desecador de vacío hasta peso constante.

Las soluciones y suspensiones utilizadas en las determinaciones cuantitativas se mezclaron mediante el uso de un Super-Mixer (Lab-Line Instruments Inc.) y se mantuvieron en agitación empleando un Vibro Mixer modelo E-1 (Chemie-Apparatebau A. G., Suiza).

Los espectros de absorción en el ultravioleta y en el visible fueron registrados en un espectrofotómetro Beckman DK-2A. Las determinaciones colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Beckman DU y la concentración del compuesto en la muestra se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% = \frac{A \times 100}{b \times c}$$

donde,

- A: absorbancia de la solución conteniendo la muestra
 b: pendiente de la curva patrón (ml/mg)
 c: concentración de la muestra (mg/ml)

En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo.

La determinación de nitrógeno se llevó a cabo por el método de Dumas-Pregl (1958) y salvo otra indicación, se expresó como "proteína" luego de multiplicar por el factor 6,25. El contenido en metoxilo se determinó por el método de Belcher y col., (1955), y un blanco efectuado con patrón de albúmina de suero bovino dio un valor de 1,05 %. Las cenizas se expresaron como el peso del residuo de la calcinación en un horno a 800 C y en corriente de oxígeno.

U L T R A C E N T R I F U G A C I O N

Las placas de sedimentación se obtuvieron con una ultracentrífuga Spinco modelo E, a 20° y velocidades de corrida de 47.660 rpm y de 42.040 rpm, y a 21° y una velocidad de corrida de 59.780 rpm.

Las determinaciones fueron llevadas a cabo con soluciones de las distintas fracciones del 0,35 % al 1,0 % en solución de cloruro de sodio 0,1 M, en soluciones buffer preparadas según la técnica de Miller y Golder (1950) de pH 2,5 y pH 10,5 (fuerza iónica 0,1, correspondiendo al cloruro de sodio el 80 % de la misma), y en soluciones de dodecilsulfato de sodio 0,5 M y 0,1 M en cloruro de sodio 0,1 M.

Para la hemicelulosa A se usó una solución 0,3 % en hidróxido de potasio 30 %, obtenida a partir de una suspensión al 0,5 % y centrifugación del insoluble.

Se midió la variación de la distancia del máximo del pico al eje de rotación durante la ultracentrifugación y se graficó el $\log x$ en función del tiempo. Se obtuvo así una línea recta y de la pendiente de la misma, calculada por el método de los cuadrados mínimos, y utilizando factores de conversión de unidades, se calculó el coeficiente de sedimentación (S):

$$S = \frac{2,303 \frac{d \log x}{dt}}{(2\pi r)^2 \frac{v^2}{50}}$$

donde,

- x: distancia (cm)
 t: tiempo (minutos)
 v: velocidad (rpm)

En algunos casos se efectuaron corridas a diferentes concentraciones y del gráfico de $1/S$ en función de la concentración, se calculó el coeficiente de sedimentación por extrapolación a dilución infinita.

M E T O D O S C R O M A T O G R A F I C O SC R O M A T O G R A F I A S O B R E P A P E L Y P L A C A
D E L G A D A

Las cromatografías sobre papel se realizaron por el método descendente empleando papel Whatman N° 1 y 3 MM.

Para las cromatografías en placa delgada se utilizaron celulosa microcristalina Avicel (F. M. C. Corporation, E.E.U.U.) y Silicagel G (Merck, Alemania) como fases fijas, aplicadas sobre placas de vidrio de 10 cm x 20 cm para las cromatografías analíticas, y de 20 cm x 20 cm para las preparativas.

SOLVENTES

Las relaciones se expresaron en volumen.

- 1) n-butanol, piridina, agua; 6:4:3
- 2) n-butanol, piridina, agua; 9:5:8
- 3) acetato de etilo, piridina, agua; 10:4:3
- 4) acetato de etilo, piridina, agua; 2:1:2 (capa superior)
- 5) acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua; 90:15:5:20
- 6) n-propanol, agua; 7:3
- 7) n-propanol, amoníaco, agua; 6:3:1

REACTIVOS PARA REVELADOa) Biftalato de anilina:

Se preparó disolviendo 0,93 g de anilina (bidestilada al vacío sobre Zn) y 1,6 g de ácido ftálico en 100 ml de n-butanol saturado con agua. Los cromatogramas se rociaron con el reactivo y se secaron en estufa a 105° durante 5 minutos. Las aldohexosas y los ácidos urónicos adquieren color marrón, mientras que las aldopentosas presentan color rosado.

El reactivo se preparó también según la técnica descrita por Wilson (1959). Se disolvieron 1,66 g de ácido ftálico y 0,91 g de anilina en una mezcla formada por 48 ml de n-butanol, 48 ml de éter etílico y 4 ml de agua. El reactivo es estable por dos semanas, guardado en heladera. Los cromatogramas se sumergieron en el reactivo, se secaron a temperatura ambiente y se revelaron calentando en estufa a 105° durante 10 a 15 minutos.

b) Clorhidrato de p-anisidina:

Se preparó según la técnica de Pridham (1956), disolviendo 1,0 g de clorhidrato de p-anisidina en 10 ml de metanol absoluto y llevando a 100 ml con n-butanol. Se agregó 0,1 g de hidrosulfito de sodio y se guardó la solución en heladera. Los cromatogramas se rociaron con

el reactivo y se secaron en estufa a 120° durante 10 minutos. Las aldopentosas dan color rosado, los ácidos urónicos marrón rojizo y las aldohexosas marrón. Se detectan de 1 a 15 μg de azúcar reductor.

c) Nitrato de plata-hidróxido de sodio:

Se preparó según la técnica descrita por Trevelyan y col. (1950). Se agregaron 0,1 ml de una solución acuosa saturada de nitrato de plata a 20 ml de acetona. El precipitado de nitrato de plata obtenido se redisolvió por agregado de la mínima cantidad de agua. Los cromatogramas se sumergieron en la solución anterior y se secaron a temperatura ambiente. Después de 3 a 4 minutos se pulverizaron con solución de hidróxido de sodio 0,5 N en etanol 50 %.

Los azúcares reductores y alcoholes polihidroxilados aparecen como manchas marrón oscuras. Las manchas obtenidas se fijaron, según la técnica descrita por Benson y col. (1952), por inmersión en una solución acuosa de tiosulfato de sodio 5 %. La cantidad mínima detectable de azúcares reductores es de 2 a 20 μg .

d) Reactivo para cetosas: resorcinol ácido-clorhídrico

Se preparó según la técnica descrita por Hough y col. (1950). Se pulverizaron los cromatogramas con la solución que resultó de mezclar volúmenes iguales de una solución 1 % de resorcinol en n-butanol y ácido clorhídrico 0,25 N. La mezcla se preparó inmediatamente antes de su uso. Los cromatogramas se secaron a temperatura ambiente y se revelaron por calentamiento en estufa a 80° durante 10 minutos. Las cetosas dan un color rojo característico. En estas condiciones las aldosas no revelan.

e) Reactivo para alcoholes polihidroxilados: ácido periódico-bencidina

Se preparó según la técnica de Gordon y col. (1956). La solución madre de ácido periódico se obtuvo disolviendo 228 mg de ácido periódico en 10 ml de agua. Esta solución es relativamente estable y puede ser guardada por varias semanas a temperatura ambiente. El reactivo de ácido periódico para el revelado se preparó diluyendo 1 ml de la solución madre con 19 ml de acetona. Esta solución es inestable y debe ser preparada con no más de tres horas de anticipación. Es un oxidante específico de 1,2-glicoles.

El reactivo de bencidina se preparó disolviendo 184 mg de bencidina en una mezcla de 0,6 ml de ácido acético glacial, 4,4 ml de agua y 95 ml de acetona. La solución resultante es amarilla y puede conservarse indefinidamente. Sirve para detectar el ácido periódico que no reaccionó.

El revelado de los cromatogramas se llevó a cabo pulverizando el papel con el reactivo de ácido periódico, dejándolo secar al aire a

temperatura ambiente durante 3 ó 4 minutos, pulverizándolo finalmente con la solución de bencidina y dejándolo secar nuevamente al aire. A medida que el cromatograma se va secando, el fondo adquiere el color azul característico de la bencidina oxidada ("azul de bencidina") y sobre el mismo se observan las manchas blancas o amarillas indicativas de la presencia de alcoholes polihidroxilados. El máximo contraste se obtiene dentro de los 5 a 10 minutos.

f) Reactivo para aminoazúcares: acetilacetona-dimetilaminobenzaldehído

Se preparó según la técnica descrita por Partridge (1949). El reactivo de acetilacetona se preparó agregando 0,5 ml de una solución de hidróxido de potasio 10 % en etanol-agua (4:1, en vol.) a 10 ml de una solución de acetilacetona-n-butanol (1:100, en vol.). El reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído se obtuvo disolviendo 1 g del mismo en 30 ml de etanol y agregando 30 ml de ácido clorhídrico concentrado. La solución se diluyó a 100 ml con n-butanol redestilado. Esta solución es estable por varias semanas.

Los cromatogramas son pulverizados primero con el reactivo de acetilacetona y se calientan a 105° durante 5 minutos. Se pulverizan luego con el reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído y se revelan por calentamiento a 90° durante 5 minutos. Las hexosaminas libres dan manchas color rojo y la N-acetilglucosamina da manchas color púrpura violáceo.

g) Reactivo para aminoácidos: ninhidrina

Se preparó según la técnica de Consden (1948). Se disolvió 0,3 g. de ninhidrina en 100 ml de una mezcla de 95 partes de n-butanol y 5 partes de ácido acético 2 N (en volumen). Los cromatogramas, una vez pulverizados, se secaron al aire y finalmente en estufa a 105° durante 5 minutos. Los aminoácidos adquieren un color azul violáceo característico.

C R O M A T O G R A F I A G A S E O S A

La identificación y valoración de los azúcares por cromatografía gas-líquido, se llevó a cabo siguiendo las técnicas descritas por Reinhold (1972) para el análisis de los hidratos de carbono comúnmente encontrados en las glicoproteínas (ver Apéndice, pág. 217). Se utilizó un Hewlett-Packard Research Gas Chromatograph modelo 5750 B, equipado con un detector de ionización de llama y un registrador Hewlett-Packard modelo 7127 A.

METANOLISIS

Las soluciones de cloruro de hidrógeno en metanol se prepararon siguiendo la técnica de Rees y Wight (1969) por adición de cloruro

de acetilo a metanol anhidro: 3,5:100, en vol. para la solución 0,5 M y 2,9:100, en vol. para la solución al 1,5 %.

Procedimiento 1

La muestra (1,50-8,00 mg (\pm 0,02 mg) dependiendo de la cantidad y composición en hidratos de carbono) se pesó en un tubo para precintarse de 3 ml, junto con mesoinositol (The British Drug Houses Ltd., Inglaterra) como patrón interno de referencia (0,30-0,50 mg (\pm 0,02 mg)). Se precintó el tubo y se agregó 1 ml de la solución de cloruro de hidrógeno 0,5 M en metanol anhidro. El calentamiento se efectuó a 65° durante 16 horas.

Procedimiento 2

Se pesaron la muestra y el mesoinositol según lo indicado en el Procedimiento 1, pero se llevó a cabo la hidrólisis previa por el método de Albersheim y col. (1967), tratándolos con solución de ácido trifluoracético 2 N (0,2 ml) durante 2 horas a 121°. La muestra se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno y se prepararon los metilglicósidos de acuerdo con el Procedimiento 1. El tratamiento con solución acuosa de ácido trifluoracético tiene por objeto la recuperación total de los aminoazúcares.

Procedimiento 3

Con el objeto de asegurar un máximo de recuperación de los ácidos neuramínicos, la metanólisis se llevó a cabo durante 1,5 horas en vez de 16 horas, seguida por la evaporación del solvente y la derivatización directa.

En los tres procedimientos se efectuaron paralelamente blancos libres de muestra.

TRATAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE METANOLISIS

Las muestras provenientes de las metanólisis, efectuadas por los Procedimientos 1 ó 2, se llevaron a seco bajo corriente de nitrógeno y la N-acetilación de los grupos amino libres se efectuó en el mismo tubo suspendiendo o disolviendo el material en 0,1 ml de piridina anhidra y agregando 0,1 ml de anhídrido acético. Se agitó y se evaporó a sequedad y la O-acetilación parcial simultánea producida se eliminó, luego de precintarse el tubo, refluendo con 1 ml de solución de cloruro de hidrógeno 0,5 M en metanol anhidro durante 1 hora. Luego de evaporar el solvente las muestras fueron secadas en desecador de vacío sobre pentóxido de fósforo e hidróxido de sodio durante una noche antes de ser derivatizadas.

PREPARACION DE LOS TRIMETILSILIL DERIVADOS

Se utilizaron como derivados de los hidratos de carbono los O-trimetilsilil (TMS) éteres, preparados según la técnica de Sweeley y col. (1963).

Reactivos necesarios:

Piridina anhidra, bidestilada sobre hidróxido de sodio y guardaba sobre hidruro de calcio en ausencia de luz.

Hexametildisilazano.

Trimetilclorosilano.

Ambos reactivos fueron usados tal como se suministran comercialmente.

Procedimiento:

El hidrato de carbono, convenientemente pesado (5-10 mg) en el tubo de reacción y precintado, se disolvió o suspendió en piridina (1 ml), y luego se trató, primero con hexametildisilazano (0,2 ml), seguido de trimetilclorosilano (0,1 ml). La mezcla se agitó durante 30 segundos hasta disolución total de los hidratos de carbono, después de lo cual se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Previo a la inyección en el cromatógrafo gaseoso se centrifugó la mezcla durante 20 a 30 minutos. En estas condiciones, la solución de los TMS derivados puede ser conservada en refrigerador durante varias semanas.

EXTRACCION DE LOS TMS DERIVADOS

Con el objeto de evitar un pico excesivo de la piridina, que pudiera interferir en la determinación de los hidratos de carbono de bajos tiempos de retención, los TMS derivados fueron extraídos con n-heptano. Para ello se separó por centrifugación el material insoluble en el reactivo de sililación, se concentró la solución sobrenadante bajo corriente de nitrógeno, centrifugando el material insoluble durante la evaporación, y finalmente la solución concentrada (0,2 ml aproximadamente) se extrajo con n-heptano (1 ml x 3) y se separaron los sobrenadantes por centrifugación. Estos se reunieron y se evaporó el exceso de n-heptano hasta 100 μ l aproximadamente, con lo que la muestra quedó lista para la inyección en el cromatógrafo gaseoso. Para la inyección de las muestras se utilizó una jeringa Hamilton 701 N (10 μ l), empleando el método del "solvent flush": se tomaron 1 a 2 μ l de solvente con la jeringa seguidos de un pequeño volumen de aire y luego la muestra.

PREPARACION DE LOS AZUCARES TESTIGO

Se utilizaron monosacáridos comerciales (The British Drug Houses Ltd., Inglaterra) que se secaron hasta peso constante y se usaron sin purificar. (Resultaron cromatográficamente puros por cromatografía

sobre papel).

Método 1

Se prepararon los metilglicósidos de la L-arabinosa, D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, L-ramnosa, D-glucuronato de metilo, D-galacturonato de metilo y 4-O-metil-D-glucuronato de metilo siguiendo el Procedimiento 1. La remoción del solvente se llevó a cabo bajo corriente de nitrógeno.

Los derivados de las aminohexosas (metil-2-acetamido-2-desoxi-D-galactosa y metil-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa) se obtuvieron tanto a partir del clorhidrato de hexosamina como a partir del N-acetil derivado correspondiente, siguiendo el Procedimiento 1 y el tratamiento posterior indicado para los productos de metanólisis de las glicoproteínas.

El metilglicósido del N-acetil-neuraminato de metilo se preparó de acuerdo a lo indicado en el Procedimiento 3.

Método 2

La preparación de los metilglicósidos de la L-arabinosa, D-xilosa, D-manosa y L-fucosa, se llevó a cabo refluendo durante 3 horas 1 g del azúcar con 20 ml de solución de cloruro de hidrógeno 1,5 % en metanol anhidro. El ácido se neutralizó con carbonato de plata y la solución se filtró, se trató con carbón activado y se refiltró. El filtrado se evaporó a presión reducida hasta obtener un jarabe, que se dejó cristalizar. Los derivados se secaron a alto vacío y se utilizaron tal cual.

Carbonato de plata: se preparó por adición de una solución de carbonato de sodio 8,8 % a una solución de nitrato de plata 8,6 %. La solución de carbonato de sodio se agregó lentamente y con agitación vigorosa. Se filtró, se lavó con acetona y se secó al aire. Todas las operaciones se efectuaron en la penumbra.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES TESTIGO

Se utilizaron soluciones testigo conteniendo el azúcar y el mesoinositol en relaciones molares variables (0,5 a 2), y mezclas de dos a tres monosacáridos con mesoinositol en distintas relaciones molares. Para ello se pesaron las cantidades adecuadas de azúcar libre y mesoinositol, no superando el total los 10 mg, y se prepararon los metilglicósidos siguiendo el Método 1 y utilizando 2 ml de solución de cloruro de hidrógeno 0,5 M en metanol anhidro.

Los TMS derivados se prepararon en la forma indicada en la técnica general.

Las soluciones testigo conteniendo los metilglicósidos obteni-

dos por el Método 2, se prepararon pesando las cantidades correspondientes del derivado y del mesoinositol (relación molar 0,5 a 2) y sintetizando directamente los TMS derivados.

PREPARACION DE LAS COLUMNAS

Se emplearon columnas de acero inoxidable de 6 pies de largo (1,83 m) por 1,8 y 1,5 mm de diámetro interno.

Las columnas utilizadas fueron de tres tipos: (1) SE-30 al 3 % sobre Chromosorb W AW/DMCS, malla 60-80; (2) OV-17 al 3 % sobre Chromosorb W HP, malla 80-100 (ambas columnas se usaron tal como se suministran comercialmente, Hewlett-Packard Ltd.); y (3) OV-17 al 0,5 % sobre Chromosorb G AW/DMCS, malla 60-80. Esta última se preparó disolviendo 0,05 g de la fase líquida (OV-17) en 5 ml de cloroformo y agregando la solución a 10 g del soporte (Applied Science Laboratories Inc.) colocados en un recipiente. El solvente se dejó evaporar espontáneamente mientras se agitó el recipiente. Se procedió luego al empaquetamiento de la columna y al acondicionamiento de la misma desde temperatura ambiente hasta 250° (1°/min), manteniéndola a esta temperatura durante 2 horas y utilizando un flujo de nitrógeno de 5 ml/minuto.

CONDICIONES DE OPERACION

Las condiciones de operación empleadas (sistema dual) están indicadas en la Tabla 54.

Tabla 54. Condiciones de operación utilizadas en la cromatografía gaseosa.

Condiciones	OV-17 3%	OV-17 0,5%	SE-30 3%
Gas portador	Nitrógeno	Nitrógeno	Nitrógeno
Flujo de gases:			
Portador (ml/min)	30	30	30
Aire (ml/min)	300	300	300
Hidrógeno (ml/min)	26	26	26
Temperatura:			
Cámara de inyección (°)	150	140	170
Detector (°)	310	250	310
Operación de la columna	programada	programada	programada
Temperatura inicial (°)	100	80	120
Temperatura final (°)	260	220	220
Velocidad del programa (°/min)	8	10	4
Velocidad de la carta:			
Anál. cualitativo (pulg/min)	0,25	0,25	0,25
Anál. cuantitativo (pulg/min)	0,50	0,50	0,25

ANÁLISIS CUALITATIVO

La solución piridínica o n-heptanólica de los TMS derivados de los metilglicósidos, se inyectó en las columnas apropiadas. Con las soluciones testigo se calcularon los tiempos de retención relativos a mesoinositol y las áreas de los picos del "pattern" característico para cada azúcar (Tabla 55).

En base a los datos obtenidos se determinó la composición en Tabla 55. Propiedades obtenidas por cromatografía gaseosa de los TMS derivados de los metilglicósidos de los monosacáridos estudiados

COMPLEJOS ^a	OV-17 3 %		OV-17 0,5 %		SE-30 3 %	
	RETENCION RELATIVA ^b	AREA DEL PICO(%) ^c	RETENCION RELATIVA ^b	AREA DEL PICO(%) ^c	RETENCION RELATIVA ^b	AREA DEL PICO(%) ^c
PENTOSAS						
Arabinosa	0,54	100	0,47	100	0,38	91
	0,60	p ^d			0,43	9
Xilosa	0,67	100	0,58	100	0,49	71
	0,73	p			0,51	29
HEXOSAS						
Manosa	0,76	100	0,72	100	0,64	90
	0,78	p ^d			0,72	10
	0,83	p				
Galactosa	0,79	p				
	0,83	69	0,80	81		
	0,85	25	0,82	19		
	0,90	6				
Glucosa	0,90	100	0,86	100		
	0,94	p				
DESOXIHEXOSAS						
Fucosa	0,60	65	0,52	67	0,41	100
	0,62	20	0,60	33		
	0,66	15				
Ramnosa	0,57	100			0,42	100
	0,64	p				
ACETAMIDOHEXOSAS						
N-Acetilgalactosamina	0,84 ^e	(43) ^f				
	1,13	8 (7) ^f	1,13	78		
	1,18	92 (40) ^f	1,17	22		
	1,22	p (10) ^f				
N-Acetilglucosamina	0,88 ^e	(61) ^f				
	0,92 ^e	(22) ^f	1,12	p		
	1,17	p	1,14	} 100		
	1,19	100 (17) ^f	1,18			
ESTERES METILICOS DE ACIDOS HEXOURONICOS						
Galacturonato de metilo	0,82	16	0,83	17		
	0,85	9	-	p		
	0,97	57	0,92	52		
	1,00	18	1,04	31		
Glucuronato de metilo	0,87	3	0,85	p		
	0,94	47	0,91	-9		
	1,00	15				
	1,03	35	1,03	-9		
MISCELANEOS						
N-Acetilneuraminato de metilo	1,24	p				
	1,38	70				
	1,40	p				
	1,44	30				
4-O-metilglucuronato de metilo	0,92	100				
Glicerol	0,22	100			0,15	100
Eritritol ^h	0,43	100			0,33	100

- ^a Los compuestos fueron examinados como los trimetilsilil derivados de los metilglicósidos correspondientes, obtenidos como mezclas de equilibrio.
- ^b Los tiempos de retención relativos están dados respecto a mesoinositol.
- ^c Se expresaron como porcentaje del área total y se incluyeron sólo los valores correspondientes a los picos significativos; p, indica un pico poco importante que no fue considerado para el cálculo de la respuesta relativa molar.
- ^d No se incluyó en el cálculo de la respuesta relativa molar por la superposición que presenta con picos de otros compuestos.
- ^e Se observaron solamente partiendo del clorhidrato de la hexosamina.
- ^f Valores obtenidos partiendo del clorhidrato de la hexosamina.
- ^g No se analizó sin patrón interno.
- ^h El D-treitol presenta la misma retención relativa, aún variando las condiciones de operación.

monosacáridos de los hidratos de carbono de las muestras. La identidad de los azúcares se determinó por referencia a los compuestos auténticos y se verificó por co-cromatografía con los mismos.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

La calibración del procedimiento total utilizado (desde la metanolisis hasta el sistema de detección y registro) se llevó a cabo por el método de la calibración relativa. Los factores de calibración (respuestas relativas molares) reflejan la recuperación total resultante de aplicar a los azúcares testigos, la secuencia de operaciones descriptas.

Para cada uno de los azúcares analizados, se cromatografiaron soluciones conteniendo cantidades distintas de los TMS derivados de los metilglicósidos junto con el patrón interno. Se midieron las áreas de los picos y para aquellos azúcares que aparecen en dos o más formas, al área total se tomó como la suma del área de los respectivos picos. La integración se llevó a cabo multiplicando la altura del pico por el ancho a la altura media, usando una regla graduada al mm. Las áreas de los picos no resueltos totalmente se calcularon por sucesivas triangulaciones.

Se graficó el área relativa total del azúcar respecto a la del patrón interno en función de la relación molar correspondiente (Figura 55), y la respuesta relativa (Tabla 56) se calculó de la pendiente de la recta. En todos los casos se observó linealidad para el rango de concentraciones usado.

Cálculos

Las muestras se analizaron en presencia del patrón interno, y usando la respuesta relativa molar del azúcar con respecto al mismo (Tabla 56), se calcularon las cantidades de cada monosacárido presente en la muestra mediante la siguiente expresión:

$$g/100\ g = \frac{A \times P \times M \times 100}{\alpha \times m} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde,

A: área relativa molar del monosacárido

P: moles de patrón interno agregados a la muestra

M: peso molecular del monosacárido en la cadena (peso molecular -18)

α : respuesta relativa molar

m: peso de la muestra (g)

A los efectos de expresar los datos con respecto al total de hidratos de carbono recuperados, se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{moles/ 100 moles} = \frac{A \times 100}{\alpha \times s} \quad (\text{ecuación 2})$$

donde,

s: número total de moles de monosacáridos recuperados.

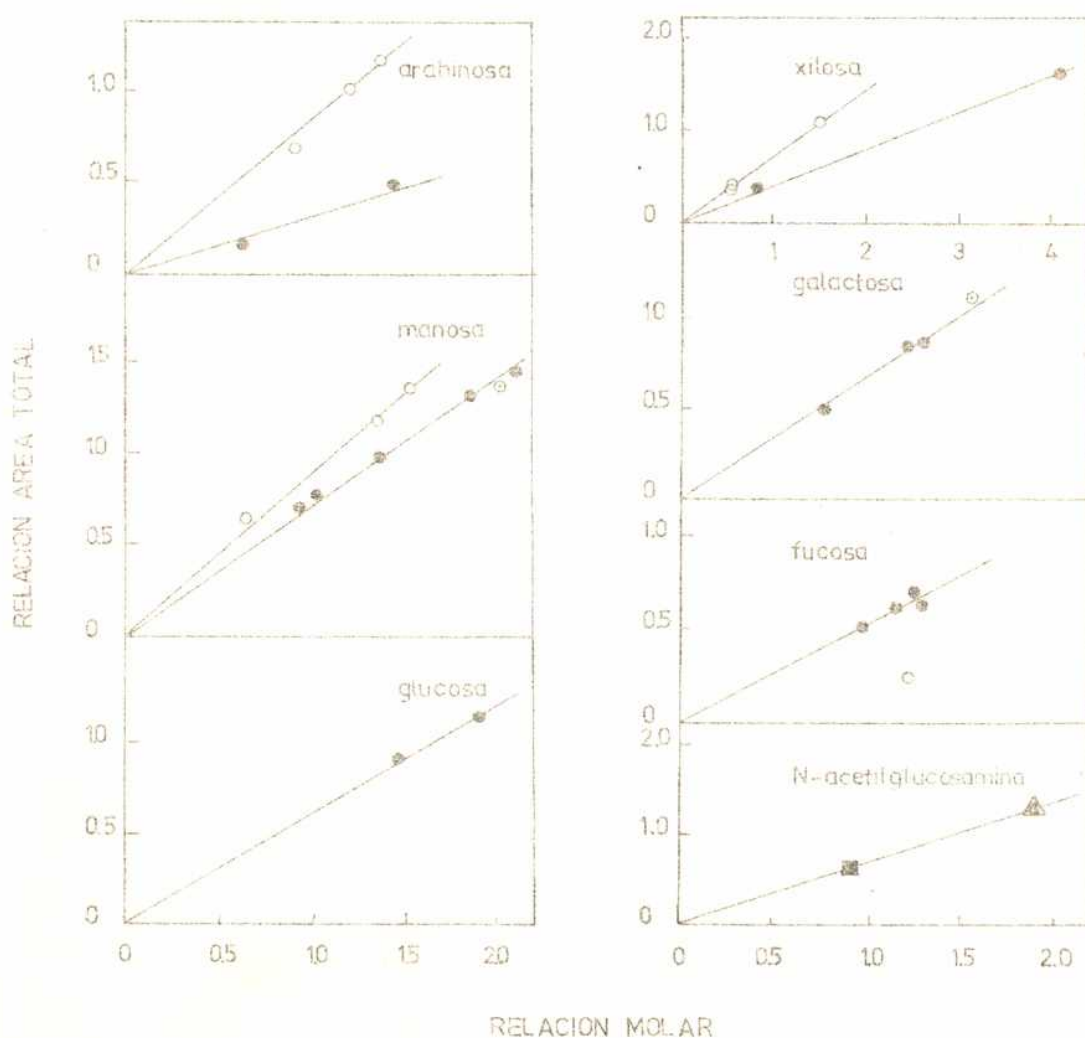


Figura 55. Representación del área relativa total del azúcar respecto del patrón interno (inositol) en función de la relación molar. La respuesta relativa molar está dada por la pendiente. Valores obtenidos por el método 1 sobre N-17 3% (●), por el método 2 sobre N-17 0,5% (○), por el método 1 sobre N-17 3%, previa extracción con n-heptano (■), por el método 1 sobre N-17, a partir de la N-acetilglucosamina (▲) y del clorhidrato de glucosamina (▲).

Observaciones

Periódicamente se controlaron las respuestas relativas molares de los distintos monosacáridos.

Los blancos preparados por los tres procedimientos de metanólisis, fueron sometidos al tratamiento posterior y a la derivatización

para conocer los picos provenientes de los reactivos, de los solventes, de artefactos de los mismos o de impurezas, y la posibilidad de ataque de los tapones utilizados.

Como la proporción de las áreas de los picos de monosacáridos que presentan multipletes es constante dentro de los límites del error experimental (Tabla 55), la cantidad de monosacáridos se calculó, para aquellos casos en que hay superposición de picos de distintos monosacáridos, a partir del o de los picos no superpuestos.

El método (ecuación 2) posee una exactitud de $\pm 8-10\%$.

Tabla 56. Respuesta relativa molar de los TMS derivados de los metilglicósidos de los monosacáridos estudiados.^a

COMPUESTO	RESPUESTA ^b RELATIVA
PENTOSAS	
Arabinosa	0,33
Xilosa	0,45
HEXOSAS	
Manosa	0,74
Galactosa	0,69
Glucosa	0,64
DESOXIHEXOSAS	
Fucosa	0,55
Ramnosa	0,96
ACETAMIDOHEXOSAS	
N-Acetilgalactosamina	0,86
N-Acetilglucosamina	0,70
ESTERES METILICOS DE ACIDOS HEXURONICOS ^c	
Galacturonato de metilo	0,54
Glucuronato de metilo	1,01
MISCELANEOS	
N-Acetilneuraminato de metilo	0,69

^a Valores de recuperación resultantes de aplicar a los compuestos la secuencia de operaciones indicadas.

^b Determinados respecto a mesoinositol como patrón interno, sobre OV-17 3 %.

^c Para la determinación de la respuesta relativa molar, se efectuó paralelamente la cromatografía gaseosa de las soluciones testigo sin patrón interno, se calcularon las áreas relativas de los picos característicos y a partir de éstas, las áreas de los picos oscurecidos por el mesoinositol.

C R O M A T O G R A F I A S O B R E G E L E S

La separación y purificación de las fracciones por cromatografía sobre geles, se llevó a cabo sobre los siguientes tipos: Sephadex G-200, G-100, G-25 y G-15, partícula fina (AB Pharmacia, Uppsala, Suecia), utilizando un colector de fracciones Gilson (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin).

La preparación de los geles se realizó agregando las partículas secas, lentamente y con agitación constante para evitar la formación de grumos, a un gran exceso de agua o de la solución usada para la elución. La hidratación del gel y el hinchamiento máximo de los mis

mos se obtuvo dejando la suspensión a temperatura ambiente durante el período de tiempo especificado para cada tipo de gel (3 hs para Sephadex G-15 y G-25, y tres días para Sephadex G-100 y G-200). Para el empaquetamiento de las columnas se utilizó una suspensión diluida de los geles, de viscosidad adecuada, a los efectos de facilitar la eliminación de las burbujas de aire. Las cromatografías se efectuaron a temperatura ambiente.

Antes de usar las columnas se controló su homogeneidad y se determinó el volumen de exclusión sembrando una solución de Blue Dextran (AB Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 0,2 % en el eluyente correspondiente y en un volumen del 1 al 2 % del volumen total de la columna. El eluido se recogió en fracciones iguales a las usadas en cada caso con las muestras. Se determinó la absorbancia del eluido a 254 nm, y del gráfico de absorbancia en función del volumen de elución, se calculó el volumen de exclusión.

Los eluyentes empleados fueron: agua, solución de cloruro de sodio 0,05 M y solución acuosa de etanol 10 %. Cuando las columnas no se usaron, se agregó al eluyente azida de sodio como agente bacteriostático en una concentración del 0,02 %.

Para las cromatografías analíticas se usaron columnas de 30 x 1,8 cm, velocidades de flujo de 6 a 9 ml/h y se recogieron fracciones de 2,7 ml. Para las preparativas se emplearon columnas de 75 x 4,5 cm, velocidades de flujo de 9 a 15 ml/h, recogiendo fracciones de 10 a 14 ml.

La eliminación de las sales se llevó a cabo sobre una columna de Sephadex G-15 (50 x 1,9 cm) con una velocidad de flujo de 20 ml/h y se recogieron fracciones de 6,9 a 7,4 ml; cuando fue necesario la recromatografía, se utilizó una columna de 45 x 3,2 cm, velocidades de flujo de 15 a 20 ml/h y se recogieron fracciones de 6,3 ml, o de 38 x 3,2 cm, recogiendo volúmenes de 6,7 ml.

Sobre las fracciones eluidas se determinó el contenido en hidratos de carbono con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico (método de Dubois y col.(1956), detallado más adelante, pág. 173), y se graficaron los valores de la absorbancia a 480 nm en función del volumen de elución. Simultáneamente se determinó la posición de las proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas y graficando en función del volumen de elución. En ambos casos se efectuaron las diluciones apropiadas y en el caso de las cromatografías analíticas, los valores se refirieron al peso de muestra sembrada para obtener datos comparables.

Se reunieron los volúmenes correspondientes a las fracciones

separadas y éstas se recuperaron por concentración y liofilización de sus soluciones.

Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizaron los siguientes tipos de intercambiadores iónicos: DEAE-Sephadex A-50 y SP-Sephadex C-50 (AB Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Los geles se prepararon en la forma antes indicada, equilibrándolos con la solución buffer a usar mediante remoción esporádica de la misma (1 a 2 días a temperatura ambiente).

Los eluyentes empleados fueron en el primer caso, solución buffer de tris 50 mM, pH 8,0 ($\mu \approx 0,03$) (se preparó mezclando 50 ml de solución de tris (trihidroximetilaminometano) 0,2 M y 26,8 ml de solución de ácido clorhídrico 0,2 M y llevando a 200 ml con agua); y en el segundo caso, solución buffer de acetato 20 mM, pH 5,0 ($\mu \approx 0,02$) (preparada mezclando 20 ml de solución de acetato de sodio 2 M y 3,7 ml de solución de ácido acético 3,5 M y diluyendo a 2 litros). En ambos casos la elución se llevó a cabo con un gradiente de cloruro de sodio (0 a 500 mM) en la solución buffer.

Las cromatografías se realizaron en una columna de 50 x 2 cm, con velocidades de flujo de 4 a 9 ml/h y se recogieron fracciones de 1 ml, utilizando un colector automático Gilson.

Sobre las fracciones eluidas se determinó el contenido en hidratos de carbono en la forma indicada para la cromatografía sobre geles, y el contenido en proteínas, por el método de Lowry y col. (1951) (ver más adelante, pág. 185). En ambos casos se efectuaron las diluciones apropiadas.

MÉTODOS ELECTROFORETICOS

ELECTROFORESIS SOBRE PAPEL.

Las electroforesis se llevaron a cabo en un aparato de electroforesis con refrigeración en las dos placas del cierre a presión (E-C Apparatus Corporations, modelo EC 451).

Para las electroforesis de las fracciones se utilizó papel de fibra de vidrio y solución de hidróxido de potasio 30 % como medio ionizante. Las muestras se sembraron en solución de hidróxido de potasio 30 % (concentración aproximada 1 %) y se efectuaron corridas de 60 a 120 minutos, aplicando de 80 a 180 volts. Los papeles se secaron a temperatura ambiente y se revelaron con solución de permanganato de potasio 0,5 % en hidróxido de sodio 1 N, calentando en estufa a 100° durante unos pocos minutos (manchas blancas o amarillo pardusco sobre fondo rosa violáceo).

Para las electroforesis de los productos de hidrólisis de las

fracciones se utilizó papel Whatman 3 MM y soluciones buffer de borato de sodio 0,2 N a pH 9,2 o de ácido acético-acetato de sodio a pH 5. Se efectuaron corridas de 2 a 4 horas aplicando de 400 a 600 volts. Los papeles se secaron primero al aire y luego en estufa, y se revelaron con solución de biftalato de anilina (revelador a).

ELECTROFORESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA

Se llevaron a cabo utilizando bandas de 8,5 x 2,5 cm equilibradas previamente con la solución buffer a utilizar. Se colocaron 4 μ l de la muestra sobre el aplicador y se sembró la misma a 1,5 cm del borde externo del extremo catódico. Las intensidades de corriente empleadas fueron de 1,5, 2,0 y 3,0 μ amp/banda durante tiempos de 15 a 60 minutos, y las soluciones buffer (buffer de Miller (Miller y Golder, 1950)) usadas, de pH 2,0, 7,0 y 8,5.

La coloración de las proteínas se efectuó sumergiendo las bandas en la solución colorante (Negro Amido 10B 0,5 % en metanol, ácido acético, agua 9:2:9, en vol.) durante cinco minutos exactos. Se eliminó el exceso de solución colorante reemplazándola por la solución de lavado (metanol, ácido acético, agua 9:2:9, en vol.) repetidas veces.

ELECTROFORESIS SOBRE GEL DE POLIACRILAMIDA

Se llevaron a cabo siguiendo la técnica descripta por Davis (1964).

Soluciones necesarias

Solución A: a 48 ml de solución de ácido clorhídrico 1 N se agregaron 36,6 g de trihidroximetilaminometano y 0,23 ml de N,N,N',N'-tetrametilen diamina y se llevó a 100 ml con agua. El pH de la solución debe ser de $8,9 \pm 0,1$.

Solución B: se disolvieron 28,0 g de acrilamida y 0,735 g de N,N'-metilenbisacrilamida en 100 ml de agua.

Ambas soluciones, una vez filtradas, son estables durante varios meses guardadas en heladera en frascos color caramelo.

Solución de persulfato de amonio 0,14 % en agua: se preparó en el momento de ser usada.

Solución madre buffer (pH 8,3): se disolvieron 6,0 g de trihidroximetilaminometano y 28,8 g de glicina en 100 ml de agua y se llevó a 1000 ml. Se usó tal cual o diluida al medio.

Preparación del gel:

Se mezclaron 1 volumen de la solución A, dos volúmenes de la solución B, un volumen de agua destilada y cuatro volúmenes de la solución de persulfato de amonio, cuidando de no introducir burbujas de ai

re, y se ~~virtió~~ la solución por la pared de los tubos, previamente tapados en su parte inferior con bases de goma, hasta aproximadamente 4 cm de la parte superior. Se agregó sobre la solución una capa de agua de 2 a 3 mm a fin de eliminar el menisco cóncavo del gel. Se dejaron los tubos en posición vertical a temperatura ambiente durante 25 a 30 minutos para producir la gelificación. La cantidad de solución preparada es de aproximadamente 10 ml cada seis tubos de 125 x 10 mm.

Procedimiento:

Se colocaron los tubos sin sus bases de goma en el aparato de electroforesis y se volcó en cada compartimiento electródico 200 ml de la solución buffer. Se disolvió la muestra (20 mg) en una solución de sacarosa al 40 % (1 ml) y se sembró (10 a 50 μ l) sobre la parte superior del gel. Se aplicó una corriente de 2 a 5 mAmp/tubo, y para visualizar la corrida se agregó al compartimiento superior, en algunos casos, una solución de azul de bromofenol al 0,1 % en etanol. Completada la migración (0,5 a 2 horas) se desprendieron los cilindros de gel y se sumergieron durante 10 minutos en la solución colorante (Negro Amido 10B 1 % en ácido acético 7 %), se lavó con agua para eliminar el exceso y luego con la solución de lavado (ácido acético 7 %) hasta completar la decoloración. Los cilindros de gel se conservaron en la misma solución de lavado.

M E T O D O S D E D I A L I S I S

Las diálisis se efectuaron a temperatura ambiente usando tubos de celulosa (Arthur H. Thomas Company, Filadelfia, E.E.U.U.) anudados en ambos extremos. Los rollos conteniendo los tubos se conservaron, dentro de sus respectivas bolsas de polietileno, a temperatura ambiente y en lugar fresco, a fin de evitar alteraciones con el tiempo.

Las diálisis preparativas se realizaron en tubos de 27/32 y 1 1/8 pulgadas de diámetro inflado, empleando agua corriente renovada a intervalos regulares de tiempo.

Las diálisis analíticas se llevaron a cabo en tubos de 1/4 de pulgada de diámetro inflado. Se disolvieron las muestras (0,06 a 0,10 g) en agua destilada (1 a 2 ml) y se dializaron contra 50 a 80 ml de agua destilada con agitación magnética constante. Se tomaron alícuotas de las aguas de diálisis y se determinó, sobre diluciones apropiadas de las mismas, el contenido en hidratos de carbono totales por el método de Dubois y col. (1956) y el contenido en cloruro de sodio por el método de Mohr. A partir de estos valores se obtuvieron los gráficos de absorbancia a 480 nm, y del volumen de solución de nitrato de plata 0,1 M, en función del tiempo de diálisis. Las aguas de diálisis se renovaron periódicamente y la fracción dializada se recuperó por concen-

tración y liofilización. La solución conteniendo la fracción no dializada se concentró y liofilizó.

Reducción del tamaño del poro:

Se utilizaron dos procedimientos:

- a) Se siguió el método de Callanan y col. (1957) que consiste en calentar los tubos de celulosa en estufa a 90° durante 24 horas.
- b) La acetilación de la membrana se realizó según la técnica descrita por Craig y Konisberg (1961).

El tubo de diálisis de la longitud adecuada, anudado en uno de sus extremos, se llenó con agua destilada y se colocó el recipiente de diálisis conteniendo piridina. El agua dentro de la membrana se eliminó por sucesivos lavados con piridina y finalmente se reemplazó ésta por una solución de anhídrido acético al 10 % en piridina anhidra. Al cabo de aproximadamente 15 horas a temperatura ambiente, la solución se reemplazó por agua y la membrana se lavó durante varias horas con solución de ácido acético 0,01 N hasta eliminar totalmente la piridina (no más reducción de la absorbancia a 260 nm luego de sucesivos lavados). La acetilación de la membrana se llevó a cabo inmediatamente antes de su uso.

MÉTODOS DE HIDROLISIS ACIDA

HIDROLISIS ACIDA TOTAL

Método 1

Las muestras se hidrolizaron por calentamiento con ácido sulfúrico 1 N (5 a 10 mg de material/ml) en un tubo cerrado durante 8 horas a 95-98°. La solución ácida se enfrió, se neutralizó con carbonato de bario, se separó por centrifugación el sulfato de bario formado y el material insoluble, y el sobrenadante se evaporó a presión reducida para insolubilizar las sales suspendidas. El hidrolizado así obtenido se tomó con agua (1 a 2 ml), se separó por centrifugación el material insoluble y se llevó nuevamente a sequedad. Se repitió el tratamiento un par de veces a los efectos de eliminar las sales de bario, y finalmente se llevó a volumen (1 ml).

En las hidrólisis preparativas o en las hidrólisis analíticas de mezclas complejas, una vez separadas las sales de bario, se procedió a la descationización y eliminación simultánea de los aminoácidos por adsorción en una columna de Amberlite IR-120 (H⁺) (3 x 0,7 cm) y lavado con agua. Los azúcares se obtuvieron por elución exhaustiva con agua y los aminoácidos, péptidos y aminoazúcares por elución con solución de hidróxido de amonio 4 N. Las fracciones se llevaron a seco por evaporación al vacío y se pesaron. Se tomaron con agua y se analizaron

por cromatografía en papel y placa delgada. La cromatografía preparativa del hidrolizado se efectuó desarrollando dos veces el cromatograma; se cortaron los papeles por las zonas correspondientes a los distintos azúcares, se eluyeron con agua y se llevaron a sequedad a presión reducida.

Para las fracciones HA y HB y para aquellas subfracciones de las mismas caracterizadas por la insolubilidad en el medio de fraccionamiento, se observó la presencia de un residuo insoluble remanente al cabo de la hidrólisis y atribuible al contenido proteico de las mismas.

Método 2

La hidrólisis se llevó a cabo en un tubo de ensayos disolviendo la muestra en ácido sulfúrico 72 % (300 mg de material/ml) y dejándolo a 30° durante 1 hora con agitación ocasional para asegurar la disolución completa. Luego de diluir con agua (28 ml/ml de ácido), se cerró el tubo y la solución se calentó a 95-98° durante 3 horas. La neutralización y purificación del hidrolizado se efectuó como en el Método 1.

Experiencias efectuadas en forma paralela por los Métodos 1 y 2 sobre la fracción HA, indicaron, por comparación de los resultados obtenidos por cromatografía sobre papel y placa delgada, la equivalencia entre ambos procedimientos de hidrólisis.

Método 3

La muestra se hidrolizó por calentamiento con ácido fórmico 5 N (5 mg de material/ml) en un tubo cerrado durante 8 horas a 100° (Waldschmidt-Leitz y Hochstraser, 1961). El hidrolizado se enfrió, se evaporó a presión reducida, se tomó con ácido clorhídrico 1 N, se descatonizó y purificó por agitación con Amberlite IR-120 (H⁺) y se llevó a sequedad por evaporación al vacío.

HIDROLISIS ACIDA PARCIAL

La muestra se suspendió en ácido sulfúrico 0,05 N (5 mg de material/ml) y se calentó en un tubo cerrado durante 2 horas a 95-98°. La fracción degradada insoluble se separó por centrifugación, se lavó con agua hasta neutralidad y se secó, y el hidrolizado se neutralizó y purificó en la forma indicada en el Método 1.

Las hidrólisis preparativas se llevaron a cabo sobre 1 g de muestra calentando en un baño de agua a ebullición. Se tomaron alícuotas del sobrenadante (0,04 ml), una vez decantado, a intervalos regulares de tiempo y se ensayó con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. El hidrolizado se neutralizó con carbonato de bario, se separó por centrifugación el precipitado de las sales de bario, el sobrenadante se fil-

tró a través de un lecho de oelite y se llevó a sequedad con etanol absoluto y evaporación a presión reducida. El producto obtenido se extrajo exhaustivamente con etanol 33 % (1 ml cada 25 mg de material) y se separó el residuo insoluble (hidrolizado insoluble en etanol 33 %) del hidrolizado soluble. El residuo insoluble conteniendo las sales de bario se extrajo sucesivamente con ácido clorhídrico 0,01 N (110 ml) en baño de agua helada durante 2 y 1/2 horas y 0,05 N (110 ml) durante una noche, y con solución saturada de sulfato de sodio (100 ml) a temperatura ambiente durante 4 días (dos veces) y a 60° (150 ml) durante 22 horas. Se midió el grado de solubilización tomando alícuotas del sobrenadante (0,1 a 1 ml) y ensayando con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. Los extractos se separaron por centrifugación y en los dos últimos casos se concentraron a una cuarta parte de su volumen, se dializaron durante 24 horas y se liofilizaron.

M E T O D O S D E O X I D A C I O N C O N P E R I O D A T O

T E C N I C A G E N E R A L

En un matraz aforado se disolvió o suspendió la muestra en la solución de metaperiodato de sodio 0,015 M (dos a cuatro veces el consumo de periodato esperado) con agitación y se llevó a volumen con la misma solución (concentración de la sustancia a oxidar de 0,3 a 0,4 %). La oxidación se realizó a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se midió el consumo de periodato y la formación de ácido fórmico a distintos tiempos hasta que se observó constancia en el consumo de oxidante y/o sobreoxidación. Paralelamente se efectuó un blanco libre de azúcar en las mismas condiciones.

DETERMINACION DEL CONSUMO DE PERIODATO.

Se llevó a cabo por el método espectrofotométrico (Guthrie, 1962).

Soluciones necesarias

Solución de metaperiodato de sodio 0,015 M: se preparó por disolución de 160,4 mg de metaperiodato de sodio en 50 ml de agua.

Solución de iodato de potasio 0,015 M: se preparó de igual forma a partir de 160,5 mg de iodato de potasio.

Construcción de la curva patrón

Se midieron las absorbancias a 223 nm de las soluciones testigo de metaperiodato de sodio y de iodato de potasio, diluidas 250 veces (los valores de absorbancia oscilan alrededor de 0,6 y 0,1, respectivamente) y se graficaron en función de las concentraciones de las soluciones originales (Figura 56).

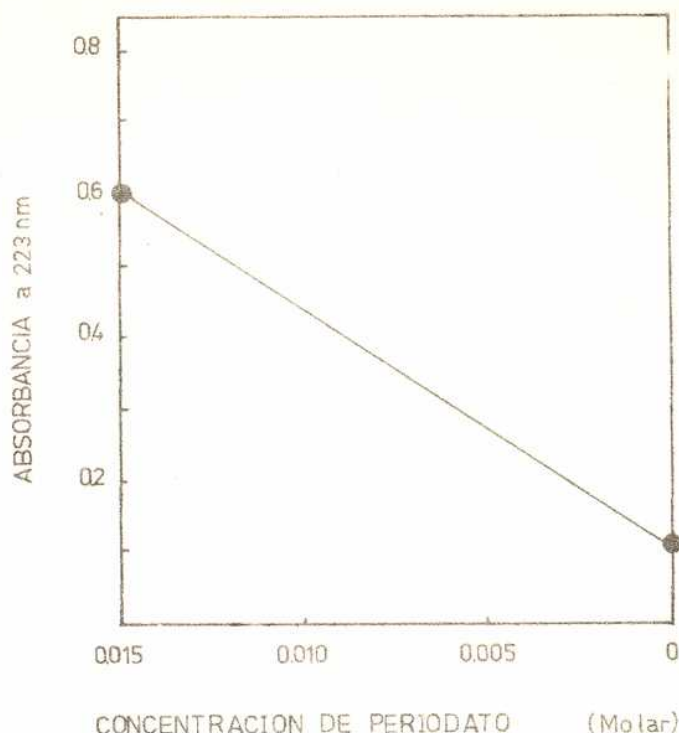


Figura 56. Determinación de la concentración de periodato por comparación con las soluciones testigo (metaperiodato de sodio 0,015 M e iodato de potasio 0,015 M).

Procedimiento

Se extrajeron alícuotas de la mezcla de oxidación y se diluyeron 250 veces. Se midió la absorbancia de la solución a 223 nm y se determinó el periodato consumido a partir de la curva patrón.

Se graficaron los valores de periodato consumido en función del tiempo de oxidación hasta valor constante; cuando se observó sobre oxidación, se extrapolaron a tiempo cero para obtener el periodato consumido. Con este dato se calcularon los gramos de polisacárido oxidado por mol de periodato consumido (independiente de la estructura del polisacárido):

$$\text{g polisacárido/mol IO}_4^- = \frac{(100 - a) \times p \times 10}{V \times m}$$

y las unidades de monosacárido oxidadas por mol de periodato consumido:

$$\text{n}^\circ \text{ unidades/mol IO}_4^- = \frac{(100 - a) \times p \times 10}{V \times m \times M}$$

donde,

- a: porcentaje de proteínas de la muestra
- p: peso de la muestra (g)
- V: volumen de la solución (ml)
- m: periodato consumido (molar)
- M: peso molecular de la unidad de monosacárido, calculada conociendo la composición del polisacárido y tomando los pesos moleculares de los monosacáridos en la cadena (hexosas, 162; hexosaminas, 161; pentosas, 132; ácidos hexourónicos, 176 y 6-desoxihexosas, 146).

DETERMINACION DEL ACIDO FORMICO PRODUCIDO

Se llevó a cabo por titulación, luego de destruir el exceso de periodato con etilenglicol, en un microtitulador Beckman-Spinco 153 con solución de hidróxido de sodio.

Soluciones necesarias

Solución de hidróxido de sodio 0,002 N

Solución de ftalato ácido de potasio 0,0005 N

Solución de etilenglicol 1 % en agua (Mallinckrodt, límite máximo de acidez, expresado como ácido acético, 0,010 %).

Fenolftaleína 0,5 % en etanol

Rojo fenol 0,2 % en etanol

Preparación de las soluciones

La solución patrón de ftalato ácido de potasio se preparó por disolución de 0,1028 g del mismo en agua libre de dióxido de carbono, y llevando a volumen en un matraz aforado de 100 ml. A partir de esta solución se preparó por dilución la solución de ftalato ácido de potasio 0,0005 N.

La valoración de la solución de hidróxido de sodio (100 μ l) se realizó en el microtitulador paralelamente a la titulación de las muestras, con la solución de ftalato ácido de potasio 0,0005 N y usando fenolftaleína como indicador (3 μ l). Se efectuó un blanco de agua destilada. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Procedimiento

A las alícuotas (50 μ l) de la solución se agregaron 5 μ l de la solución de etilenglicol, 50 μ l de agua destilada libre de dióxido de carbono y rojo fenol (3 μ l), y se efectuó la titulación con la solución valorada de hidróxido de sodio. Paralelamente se realizó un blanco con la solución de periodato libre de azúcares. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

El ácido fórmico producido se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Acido fórmico (molar)} = \frac{(V - V^0)}{(V_{Bi} - V_{Bi}^0)1000}$$

donde,

V: volumen de solución de hidróxido de sodio utilizado para titular la solución conteniendo la muestra

V⁰:idem, para el blanco correspondiente

V_{Bi}: volumen de la solución de ftalato ácido utilizado para valorar la solución de hidróxido de sodio

V_{Bi}⁰: idem, para el blanco correspondiente

Se graficaron los valores de ácido fórmico producido en función del tiempo de oxidación en la forma indicada para la determinación del consumo de periodato. Con el dato obtenido se calcularon los

gramos de polisacárido oxidado por mol de ácido fórmico producido (independiente de la estructura del polisacárido):

$$g \text{ polisacárido/mol HCOOH} = \frac{(100 - a) \times p \times 10}{V \times m}$$

y las unidades de monosacárido oxidadas por mol de ácido fórmico producido:

$$n^{\circ} \text{ unidades/mol HCOOH} = \frac{(100 - a) \times p \times 10}{V \times m \times M}$$

donde a, p, V y M tienen el significado antes indicado, y m: ácido fórmico producido (molar).

DETERMINACION DEL GRADO DE POLIMERIZACION

Se realizó siguiendo el método descripto por Unrau y Smith (1957).

La muestra (30 mg) se suspendió en 6 ml de agua, se agregaron 25 mg de borohidruro de sodio y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante lapsos comprendidos entre las 72 y 96 horas. Se agregaron 5 mg más de borohidruro de sodio y se continuó el tratamiento durante un total de 144 a 168 horas. El exceso de borohidruro se destruyó por agregado de ácido acético gota a gota, y se ajustó el pH a 7,5 con solución saturada de bicarbonato de sodio. Se llevó a volumen con agua en un matraz aforado de 25 ml y se agregaron 50 mg de metaperiodato de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Para las determinaciones se tomaron alícuotas (2 ml) del sobrenadante y el exceso de oxidante se destruyó por agregado de formiato de plomo (10 mg, exceso del 100 %) sobre baño de agua helada, y se dejó en refrigerador durante una noche. Se centrifugó el insoluble y la mezola (2 ml) se dializó contra igual volumen de agua destilada en sistema cerrado durante 48 horas. La solución externa (1 ml) se utilizó para la determinación del formaldehído producido.

Formiato de plomo: se preparó disolviendo 6,0 g de acetato de plomo trihidrato en la mínima cantidad de agua caliente y agregando 2 ml de ácido fórmico. El formiato de plomo precipitado se filtró y recristalizó dos veces de agua.

DETERMINACION DE FORMALDEHIDO

Se aplicó el método espectrofotométrico descripto por Eeigrive (1937) y adaptado por Lambert y Neish (1950).

Reactivo de ácido cromotrópico

Se preparó de acuerdo a la técnica descripta por McFadyen (1945). Se disolvió 1 g de ácido cromotrópico (The British Drug Hou-

ses Ltd.) en 100 ml de agua y se llevó a 500 ml en matraz aforado por agregado de ácido sulfúrico 12,5 M. La absorbancia de la solución resultante no debe ser superior a 0,1. La solución se conserva inalterada durante 2 a 3 semanas en la oscuridad.

Solución patrón de D-eritritol

Se oxidaron 0,15 milimoles de eritritol disueltos en 2 ml de agua, con 2 ml de solución de metaperiodato de sodio 0,3 M en presencia de bicarbonato de sodio (2 ml de solución 1 M). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para completar la oxidación. Se agregaron 90 mg de formiato de plomo y se dejó en refrigerador durante una noche. Se centrifugó el precipitado y con el sobrenadante se obtuvo la solución madre de formaldehído (0,05 M). A partir de ésta se prepararon por dilución las soluciones testigo conteniendo 0,10, 0,20, 0,40 y 0,50 $\mu\text{mol/ml}$ de formaldehído.

Procedimiento

A 1 ml de la solución de formaldehído (no más de 0,62 μmoles) se agregaron 10 ml de reactivo de ácido cromotrópico y se calentó en un baño de agua a ebullición durante 30 minutos, tapando los tubos con bolitas de vidrio. Luego de enfriar los tubos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la solución a 570 nm. Paralelamente se efectuó un blanco con 1 ml de agua destilada.

A partir de los valores obtenidos con las soluciones testigo se construyó la curva patrón (Figura 57), y en base a la absorbancia de la muestra se calculó la cantidad de formaldehído producido. El grado de polimerización se determinó usando la siguiente expresión:

$$G P = \frac{(100 - a) \times p \times y}{100 \times m \times M}$$

donde,

p: peso de la muestra (g/ml)

m: formaldehído producido (mol/ml)

y: toma el valor de 1 si el extremo reductor es una aldohexosa unida por 0-5, 0-6 u 0-2, o si es una aldopentosa unida por 0-5, 0-4 u 0-2; o el valor de 2 si es una aldohexosa unida por 0-3 u 0-4, o si es una aldopentosa unida por 0-3.

a y M tienen el significado antes indicado.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZÚCARES COMPONENTES

La determinación cuantitativa de los azúcares componentes por cromatografía gas-líquido está descripta en la parte de Métodos cromatográficos (pág. 154).

AZÚCARES TOTALES

Se llevó a cabo con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico si-

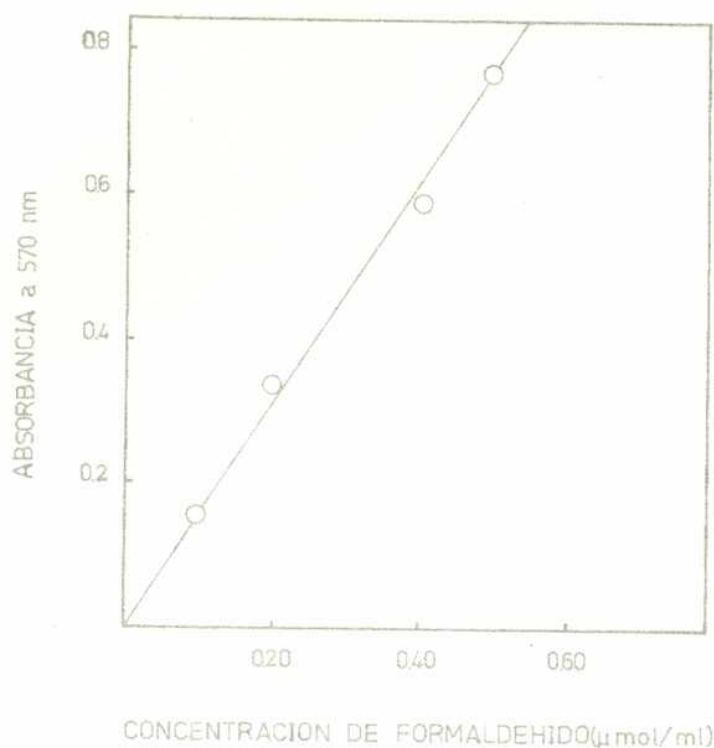


Figura 57. Curva patrón de formaldehído.

guiendo el método de Dubois y col. (1956).

Soluciones necesarias

Acido sulfúrico, grado analítico, 98,0 %. (The British Drug Houses Ltd., Inglaterra).

Solución de fenol 5 % en agua (p/v): se preparó por disolución de 2,505 g de fenol (redistilado a presión reducida en atmósfera de nitrógeno) en 50 ml de agua. La solución incolora obtenida es estable durante varios meses conservada a temperatura ambiente.

Procedimiento

A 1 ml de solución conteniendo entre 10 y 70 μg de azúcar o el peso equivalente de muestra insoluble, se le agregó 1 ml de solución de fenol 5 % y se mezcló. Con una pipeta de punta ancha se dejaron caer 5 ml de ácido sulfúrico directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un máximo de calentamiento y mezcla. Al cabo de 10 minutos los tubos se agitaron y se colocaron en un baño de agua a 25-30° durante 15 minutos. La absorbancia del color desarrollado se midió a 480 nm. La cantidad de azúcar se determinó, previa sustracción del blanco, por referencia a las curvas patrones, y se expresó, al igual que en las restantes determinaciones cuantitativas descritas (azúcares y aminoácidos) como el porcentaje del componente anhidro (peso molecular - 18).

Construcción de las curvas patrón

a) Curva patrón con azúcares testigo:

A partir de la solución madre ($700 \mu\text{g/ml}$) preparada por disolución del azúcar en agua, se obtuvieron las soluciones diluídas conteniendo entre 15 y $70 \mu\text{g/ml}$, y se graficó la absorbancia de estas soluciones testigo en función de la concentración (Figura 58).

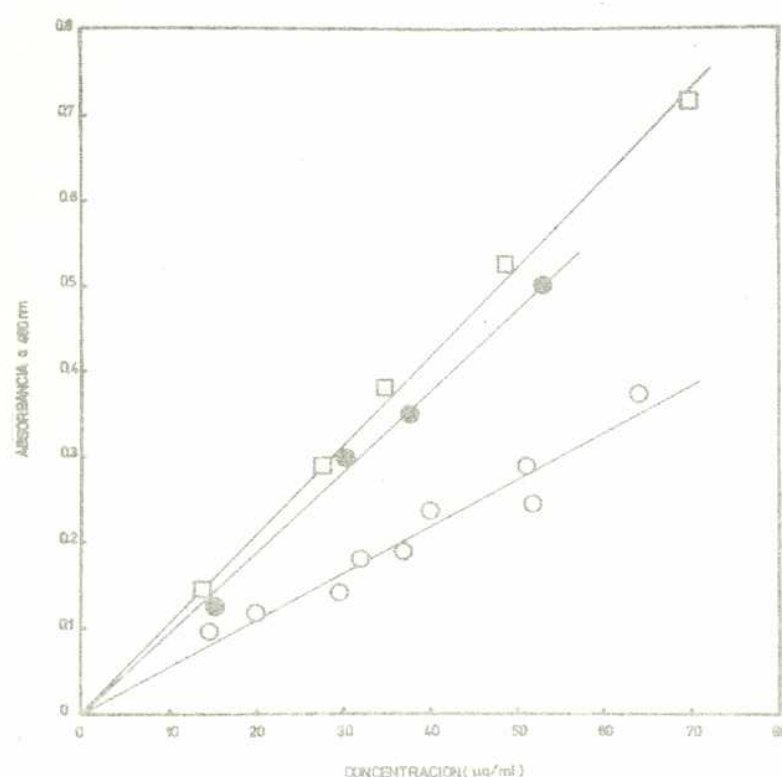


Figura 58. Curvas patrón obtenidas por el método de Dubois y col. (1956) con el reactivo de fenol-ácido sulfúrico. (\square), D-arabinosa, (\bullet), D-glucosa, (\circ), fracción HB_3 .

b) Curva patrón de la fracción HB_3 :

Se prepararon dos soluciones madres conteniendo respectivamente 1000 y $742 \mu\text{g/ml}$ de la fracción HB_3 . A partir de las mismas se prepararon las soluciones diluídas conteniendo entre $14,8$ y $64 \mu\text{g/ml}$. Se graficaron los valores de absorbancia de las soluciones testigo en función de la concentración (Figura 58) y la pendiente de la recta se calculó por el método de los cuadrados mínimos ($b = 5,46 \times 10^{-3} \text{ ml}/\mu\text{g}$).

Observaciones

Las determinaciones efectuadas sobre las muestras se llevaron a cabo con cinco soluciones de concentración distinta.

El método no es afectado por la presencia de proteínas y la exactitud ($\pm 10\%$) varía para las mezclas de azúcares ya que los coeficientes de extinción no son iguales.

Los aminoazúcares como glucosamina y galactosamina no reaccionan.

DOSAJE POR DESCARBOXILACION

Se llevó a cabo por el método de Barker y col. (1958), que es una modificación del de McCready y col. (1946), en el aparato descrito en la Figura 59.

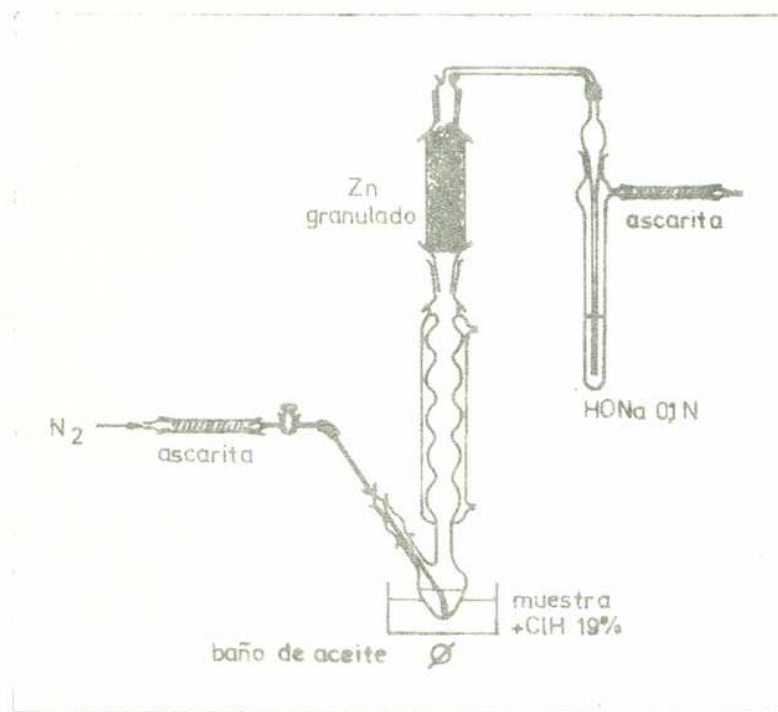


Figura 59. Aparato utilizado para la determinación de ácidos urónicos por descarboxilación.

Procedimiento

La muestra (Tabla 57) se pesó en un dedalito de 1 cm de longitud, se colocó en el balón de reacción y se agregó la solución de ácido clorhídrico 19 % (3 ml para la glucuronolactona y 30 ml para las muestras). Se hizo pasar una corriente de nitrógeno para purgar el aparato antes de conectar el tubo de absorción y luego se agregaron al mismo 5 ml de hidróxido de sodio 0,1 N. Una vez conectados, se reguló la corriente de nitrógeno en aproximadamente una burbuja cada 2 ó 3 segundos. El baño de aceite, previamente calentado a 145°, se colocó de tal manera que el nivel de aceite quedara 0,25 cm por debajo del nivel del líquido en el balón de reacción. Se calentó a 145° por 2 horas, se retiró el baño de aceite y se aumentó la corriente de nitrógeno a 2 ó 3 burbujas por segundo durante 10 minutos. Se desconectó el tubo de absorción y el hidróxido de sodio se transfirió cuidadosamente a un erlenmeyer, lavando con agua (5 x 5 ml). Se agregaron 2 ml de una solución de cloruro de bario dihidrato 10 % y dos gotas de fenolftaleína. El exceso de álcali se tituló con ácido clorhídrico 0,1 N $f = 0,980$. Se realizó un blanco sin muestra y las determinaciones se efectuaron por duplicado. Se controló el método con muestras de glucurona lactona (Ta

bla 57). Los resultados se calcularon usando la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{a \times P \times 0,1 \times f \times 100}{2 \times b}$$

donde,

a: diferencia de titulación con el blanco (ml)

b: peso de la muestra (mg)

P: peso equivalente. Para la glucuronolactona es de 176. En el caso del polisacárido se considera el peso de una unidad de ácido en la cadena (176).

Tabla 57. Determinación del contenido en ácidos urónicos por descarboxilación. Control del método.

Muestra	b (mg)	a (ml)	% Ac. Urónico
glucuronolactona	19,8	2,12	92,3
"	16,9	1,82	92,9

A C I D O S U R O N I C O S Y H E X O S A S

Se llevó a cabo por el método del carbazol (Dische, 1947), siguiendo la modificación sugerida por Galambos (1967), para la determinación independiente de ácidos urónicos y hexosas en mezclas de ambos azúcares.

Soluciones necesarias

Acido sulfúrico, grado analítico, 98,0 % (The British Drug Houses Ltd., Inglaterra).

Solución buffer de borato 1 M pH 8,4: se preparó por adición de solución de hidróxido de potasio a una solución de ácido bórico 1 M.

Solución de sulfamato 4 M: se preparó por disolución de 60 g de sulfamato de amonio en 100 ml de agua.

Solución de carbazol 0,2 % en etanol.

Soluciones patrón de azúcares testigo: a partir de la solución madre (6,25 μ moles/ml) preparada por disolución del azúcar en agua, se obtuvieron las soluciones testigo con una concentración tal que las concentraciones resultantes, luego del agregado de las soluciones de sulfamato y de borato, fueran de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 y 0,25 μ moles/ml.

Los azúcares utilizados fueron D-glucosa, D-glucuronolactona y D-galactourónico.

Procedimiento

Se pipetearon a un tubo de ensayos 0,8 ml de solución acuosa de los hidratos de carbono conteniendo de 0,06 a 0,30 μ moles/ml, o se suspendió la cantidad equivalente en peso en 0,8 ml, y se agregaron 0,1 ml de la solución de sulfamato 4 M y 0,1 ml de la solución de borato 1 M, seguido de agitación vigorosa. Se colocaron los tubos en un baño de agua helada y se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Al ir agregando el ácido se mezcló la solución y al final del agregado

se agitaron nuevamente. Se calentaron los tubos a 100° en termostato durante 6,5 minutos, y se enfriaron en agua helada. Se efectuaron las lecturas de absorbancia a 318 nm. Se agregaron luego 0,2 ml de la solución de carbazol 0,2 % y se mezcló enérgicamente. Los tubos se calentaron nuevamente a 100° durante 10 minutos, se enfriaron en corriente de aire y se leyeron las absorbancias a 525 nm. El color es estable por varias horas a temperatura ambiente. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y paralelamente se efectuaron los blancos libres de azúcar.

Se graficaron los valores de absorbancias (y) de las soluciones testigo en función de la concentración (x) y la pendiente (b) (Figura 60) se calculó usando la siguiente fórmula: $b = \frac{\sum x \cdot y}{\sum x^2}$

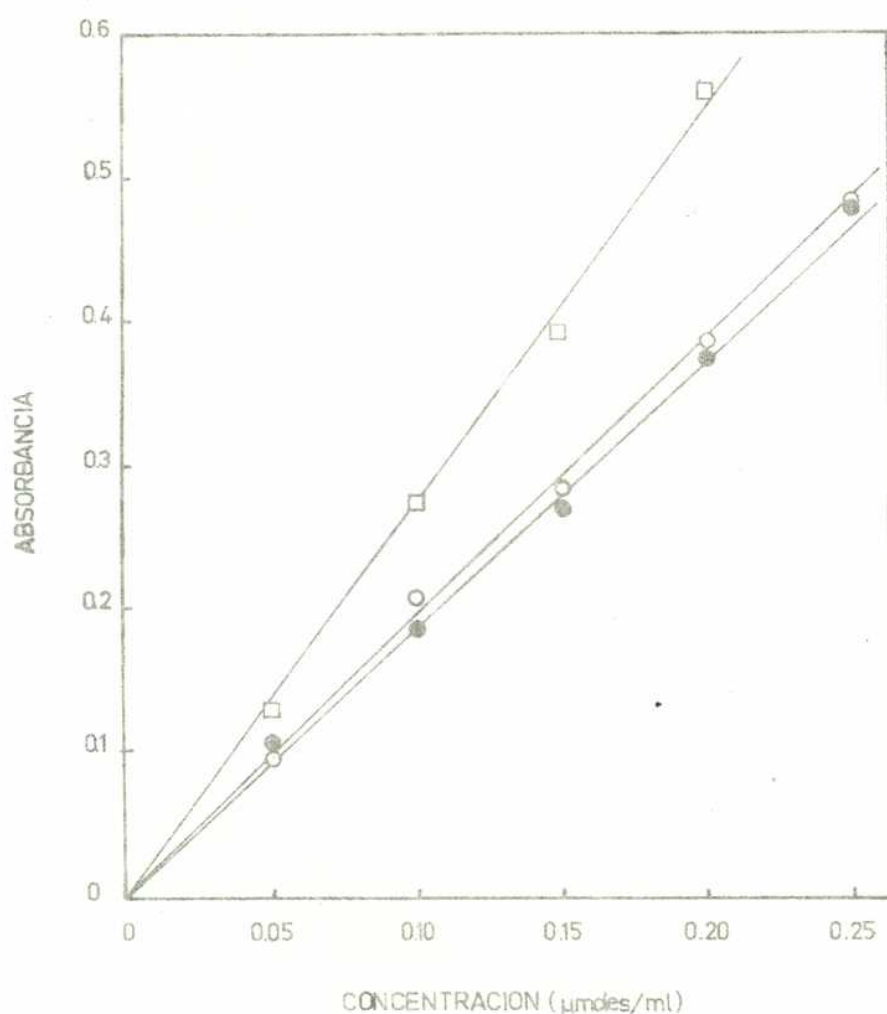


Figura 60. Curva patrón de D-glucosa (□) y de ácidos D-glucurónico (o) y D-galacturónico (Δ).

De los valores de absorbancias obtenidos con las muestras analizadas se obtuvieron los porcentajes en peso de las hexosas y ácidos hexourónicos usando las siguientes expresiones:

$$\% \text{ Acido hexourónico} = \frac{A \times 176}{10 \times P \times b_1}$$

$$\% \text{ Hexosa} = \frac{(B - f \times A) \times 162}{10 \times P \times b_2}$$

donde,

- A: absorbancia a 525 nm
- B: absorbancia a 318 nm
- P: peso de la muestra (mg)
- b₁: pendiente obtenida con las soluciones testigo de ácidos urónicos
- b₂: pendiente obtenida con las soluciones testigo de hexosas
- f: 0,76 para ácido glucurónico y 0,94 para ácido galaoturónico

La absorbancia del ácido glucurónico a 318 nm es el 76 % de la desarrollada a 525 nm en la reacción del carbazol, y en las condiciones empleadas la absorbancia a 318 nm es la suma de las respectivas absorbancias del ácido urónico y la hexosa.

Los valores se expresaron con respecto al peso molecular del monosacárido en la cadena (176 para ácidos hexourónicos y 162 para hexosas).

El método es específico para la determinación de ácidos urónicos (se verificó experimentalmente que las hexosas no dan la reacción del carbazol en esas condiciones), pero no es específico para las hexosas pues interfieren a 318 nm la glucosamina libre y la D-xilosa.

IDENTIFICACION DEL ACIDO URONICO

Se realizó por el procedimiento de Dische y Rothschild (1967) que utiliza los métodos de Dische (1947; 1950).

Soluciones necesarias

Además de las indicadas en la determinación cuantitativa de ácidos urónicos y hexosas, se utilizaron soluciones de carbazol al 0,1 % y al 0,05 %, y solución de gliadina 0,1 %.

Procedimiento 1

Se pipeteó a un tubo de ensayos 1 ml de solución conteniendo 5 a 100 μ g de ácido urónico o se preparó una suspensión de la muestra (0,2 a 0,6 mg, según el contenido en ácido urónico) en 1 ml de agua. Se colocó el tubo en un baño de agua helada y se agregaron con agitación 6 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calentaron los tubos con las soluciones en baño de agua a ebullición durante 20 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 0,2 ml de solución de carbazol 0,1 %. Se agitó vigorosamente la solución y al cabo de 2 horas se midió la absorbancia a 530 nm.

Procedimiento 2

Se pipetearon a un tubo de ensayos 0,4 ml de una solución conteniendo 0,05 a 0,5 mg de ácido urónico por ml, o se preparó una suspensión de la muestra (2,1 mg, dependiendo del contenido en ácido urónico) en 0,4 ml de agua. Se colocó el tubo en un baño de agua helada y se agregaron con agitación 5,4 ml de una mezcla de una parte de agua más seis partes de ácido sulfúrico concentrado. Una vez que la muestra

se enfrió a 0°, se mantuvo durante 3 minutos en agua corriente a temperatura ambiente y se sumergieron inmediatamente en un baño de agua a 60° durante 90 segundos. Se enfriaron en agua corriente, se agregaron 0,2 ml de solución de carbazol 0,1 % y se agitaron vigorosamente. Se midieron las absorbancias a 530 nm al cabo de 2 y 6 horas.

Procedimiento 3

Se pipetearon a un tubo de ensayos 0,5 ml de solución de ácido urónico conteniendo de 25 a 100 $\mu\text{g/ml}$, o se preparó una suspensión de la muestra (1,4 a 1,7 mg, según el contenido en ácido urónico) en 0,5 ml de agua. Se colocaron los tubos en un baño de agua helada y se agregaron, con agitación, 5 ml de una mezcla de ocho partes de ácido sulfúrico concentrado y una parte de agua. Se dejaron las soluciones durante 1 a 2 minutos en el baño de agua helada, se agitaron vigorosamente y se colocaron nuevamente en el baño de agua helada. Se agregaron 0,2 ml de solución de carbazol 0,05 % y se agitó. Se colocaron las soluciones durante unos minutos en un baño de agua corriente y se calentaron en un baño de agua a ebullición durante 120 segundos. Se enfriaron en agua corriente y al cabo de 10 a 15 minutos se midieron las absorbancias a 530 nm.

En los tres procedimientos se efectuaron paralelamente determinaciones con un blanco libre de azúcares, y se llevaron a cabo por duplicado.

Cálculos

Con los valores de absorbancias medidos se calcularon los coeficientes de extinción molares para los tres procedimientos: E86, E60 a las 2 hs., E60 a las 6 hs., y E80 respectivamente. A partir de los mismos se determinaron las relaciones $\frac{E86}{E80}$, $\frac{E86}{E60}$ (2 hs) y $\frac{E86}{E60}$ (6 hs) utilizadas para llevar a cabo la identificación tentativa de los ácidos urónicos por comparación con las soluciones testigo.

Las soluciones testigo empleadas fueron las de D-glucuronolactona (6,25 mM) y ácido D-galacturónico (6,25 mM) y se usaron para el Procedimiento 1 volúmenes de 0,05 a 0,25 ml (llevados a 1 ml), y para los restantes Procedimientos los volúmenes indicados en las técnicas correspondientes.

Con el objeto de analizar la posible interferencia de hexosas y proteínas, se utilizaron soluciones testigo de ácido galacturónico y glucosa (1,56 mM para cada componente), glucuronolactona y glucosa (3,13 mM para cada componente), y ácido galacturónico (o glucuronolactona), glucosa y gliadina (2,08 mM para cada azúcar y 0,03 % en gliadina). Se efectuaron las mediciones en la forma indicada para las solu-

ciones testigo puras, y también en presencia de sulfamato 4 M (0,1 ml) y de solución de borato 1 M (0,1 ml) siguiendo el procedimiento de Galambos (1967) antes indicado.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 58.

Tabla 58. Relación de los coeficientes de extinción molares de los ácidos glucurónico y galacturónico en la reacción original del carbazol (E86) con los coeficientes de las dos reacciones modificadas (E80 y E60).

Solución testigo	Acido glucurónico			Acido galacturónico			Fracción HA ^a		
	$\frac{E86}{E80}$	$\frac{E86(2 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86(6 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86}{E80}$	$\frac{E86(2 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86(6 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86}{E80}$	$\frac{E86(2 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86(6 \text{ hs})}{E60}$
Acido urónico	21,2	85,6	32,8	4,6	4,5	2,1	1,5	4,3	3,0
	29,0	117,0	44,8	5,6	5,4	2,5	3,9	9,5	6,0
Ac. urónico y glucosa	17,2	201,6	30,0	4,6	5,9	2,4			
	15,0 ^a		34,3 ^a	2,4 ^a	14,7 ^a	3,7 ^a			
Ac. urónico, glucosa y gliadina	15,3 ^a	44,7 ^a	23,3 ^a	4,2 ^a	18,1 ^a	8,6 ^a			

^a La determinación se llevó a cabo en presencia de sulfamato y borato.

P E N T O S A S Y H E X O S A S

Se realizó siguiendo la técnica descripta por Fernell y King (1953) para la determinación simultánea de pentosas y hexosas en mezclas de ambos azúcares.

Soluciones necesarias

Reactivo A: solución de orcinol 0,2 % en ácido sulfúrico 49 % (en peso). El reactivo es estable durante dos días conservado a 0°.

Reactivo B: se preparó por disolución de cloruro férrico hexahidrato (0,15 g) y 0,4 g de orcinol en 10 ml de agua helada y llevando a volumen (200 ml) con ácido clorhídrico 30 % (p/v).

Orcinol: debe ser recristalizado de agua en presencia de carbón activo antes de ser usado. De esta manera se obtiene el monohidrato, el cual es convertido en el producto anhidro por secado al vacío.

Procedimiento

El método es aplicable directamente a monosacáridos y oligosacáridos, a menos que contengan proteínas para lo cual es necesario la previa desproteínización. Los polisacáridos se hidrolizaron con solución de ácido clorhídrico 1 N durante 4 a 6 horas a 100° en un tubo cerrado.

La determinación se llevó a cabo en dos etapas:

a) Se agregaron 10 ml del reactivo A a 1 ml de la solución conteniendo de 5 a 25 μg de hidratos de carbono. Se mezclaron, se taparon los tubos con bolitas de vidrio y se calentaron a 100° durante 15 minutos.

ciones testigo puras, y también en presencia de sulfamato 4 M (0,1 ml) y de solución de borato 1 M (0,1 ml) siguiendo el procedimiento de Galambos (1967) antes indicado.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 58.

Tabla 58. Relación de los coeficientes de extinción molares de los ácidos glucurónico y galacturónico en la reacción original del carbazol (E86) con los coeficientes de las dos reacciones modificadas (E80 y E60).

Solución testigo	Acido glucurónico			Acido galacturónico			Fracción HA ^a		
	$\frac{E86}{E80}$	$\frac{E86(2 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86(6 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86}{E80}$	$\frac{E86(2 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86(6 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86}{E80}$	$\frac{E86(2 \text{ hs})}{E60}$	$\frac{E86(6 \text{ hs})}{E60}$
Acido urónico	21,2	85,6	32,8	4,6	4,5	2,1	1,5	4,3	3,0
	29,0	117,0	44,8	5,6	5,4	2,5	3,9	9,5	6,0
Ac. urónico y glucosa	17,2	201,6	30,0	4,6	5,9	2,4			
	15,0 ^a		34,3 ^a	2,4 ^a	14,7 ^a	3,7 ^a			
Ac. urónico, glucosa y gliadina	15,3 ^a	44,7 ^a	23,3 ^a	4,2 ^a	18,1 ^a	8,6 ^a			

^a La determinación se llevó a cabo en presencia de sulfamato y borato.

P E N T O S A S Y H E X O S A S

Se realizó siguiendo la técnica descripta por Fernell y King (1953) para la determinación simultánea de pentosas y hexosas en mezclas de ambos azúcares.

Soluciones necesarias

Reactivo A: solución de orcinol 0,2 % en ácido sulfúrico 49 % (en peso). El reactivo es estable durante dos días conservado a 0°.

Reactivo B: se preparó por disolución de cloruro férrico hexahidrato (0,15 g) y 0,4 g de orcinol en 10 ml de agua helada y llevando a volumen (200 ml) con ácido clorhídrico 30 % (p/v).

Orcinol: debe ser recristalizado de agua en presencia de carbón activo antes de ser usado. De esta manera se obtiene el monohidrato, el cual es convertido en el producto anhidro por secado al vacío.

Procedimiento

El método es aplicable directamente a monosacáridos y oligosacáridos, a menos que contengan proteínas para lo cual es necesario la previa desproteinización. Los polisacáridos se hidrolizaron con solución de ácido clorhídrico 1 N durante 4 a 6 horas a 100° en un tubo cerrado.

La determinación se llevó a cabo en dos etapas:

a) Se agregaron 10 ml del reactivo A a 1 ml de la solución conteniendo de 5 a 25 μg de hidratos de carbono. Se mezclaron, se taparon los tubos con bolitas de vidrio y se calentaron a 100° durante 15 minutos.

Se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y al cabo de 30 minutos se midió la absorbancia a 425 nm.

b) Se agregaron 6 ml del reactivo B a 2 ml de la solución conteniendo de 5 a 25 μg de hidratos de carbono por ml. Se procedió en la forma indicada para la etapa a) y se midió la absorbancia a 660 nm.

Paralelamente se efectuó en ambas etapas un blanco libre de azúcar.

Construcción del nomograma

Soluciones patrones de azúcares testigo: a partir de la solución madre (2,4 mg/ml) preparada por disolución del azúcar en agua, se obtuvieron las soluciones testigo conteniendo 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y las soluciones testigo mezcla de hexosa y pentosa (15 y 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente y 20 y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente). Los azúcares utilizados fueron D-glucosa y D-arabinosa.

Se efectuaron las determinaciones a) y b) con las soluciones testigo y se construyó el nomograma (Figura 61) teniendo en cuenta que el cociente de las distancias es el siguiente:

$$\frac{AD}{CD} = \frac{\text{Absorbancia solución testigo arabinosa a 660 nm}}{\text{Absorbancia solución testigo glucosa a 660 nm}}$$

$$\frac{AD}{BD} = \frac{\text{Absorbancia solución testigo arabinosa 425 nm}}{\text{Absorbancia solución testigo glucosa a 425 nm}}$$

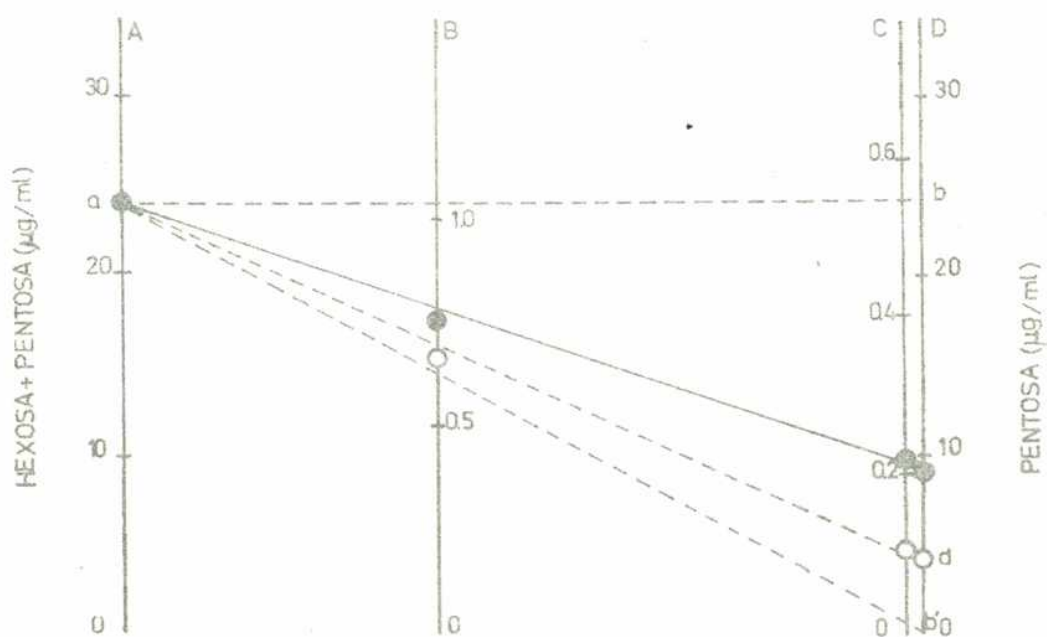


Figura 61. Nomograma para el cálculo de las cantidades de pentosas y hexosas.

A, Concentración de pentosas más hexosas; B, absorbancia a 425 nm; C, absorbancia a 660 nm; D, concentración de pentosas. Las líneas representan las curvas experimentales para: arabinosa, ab; glucosa, ab'; arabinosa:glucosa (9:15), ac; arabinosa:glucosa (4:20), ad.

Las cantidades de pentosas y hexosas presentes en las muestras se calcularon por medio del nomograma y haciendo uso de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Pentosas} = \frac{D \times 100}{p}$$

$$\% \text{ Hexosas más pentosas} = \frac{A \times 100}{p}$$

donde,

- D: concentración de pentosas obtenida del nomograma ($\mu\text{g/ml}$)
 A: concentración de pentosas más hexosas obtenida del nomograma ($\mu\text{g/ml}$)
 p: peso de la muestra en la solución ($\mu\text{g/ml}$).

A C I D O S I A L I C O

Se realizó la determinación del ácido siálico (N-acetilneuramínico) siguiendo la técnica descripta por Warren (1959). El método es altamente específico.

Soluciones necesarias

Solución de metaperiodato de sodio 0,2 M en solución de ácido fosfórico 9 M.

Solución de arsenito de sodio 10 % en solución de sulfato de sodio 0,5 M.

Solución de ácido 2-tiobarbitúrico 0,6 % en solución de sulfato de sodio 0,5 M.

Todas estas soluciones son estables por más de un mes conservadas a temperatura ambiente.

Solución patrón de ácido siálico: se preparó por disolución de 0,855 mg de ácido N-acetilneuramínico (sintético, Sigma Chemical Company) en 10 ml de agua.

Procedimiento

La determinación del ácido siálico libre se efectuó por hidrólisis de la muestra (15,21 mg) con ácido sulfúrico 0,1 N (1 ml) en un tubo cerrado durante una hora a 80°. La neutralización no es necesaria para las determinaciones.

Estas se llevaron a cabo sobre 0,2 ml de solución de hidrólisis y solución patrón (conteniendo entre 0,025 y 0,050 μmoles), utilizando un blanco de agua destilada. A cada tubo se agregó 0,1 ml de solución de periodato y se agitaron. Al cabo de 20 minutos a temperatura ambiente se agregó 1 ml de solución de arsenito y se agitaron nuevamente, hasta desaparición del color marrón amarillento característico. Seguidamente se agregaron 3 ml de la solución de ácido tiobarbitúrico. Los tubos se agitaron, se taparon con bolitas de vidrio y se colocaron en un baño de agua en ebullición vigorosa durante 15 minutos. Se en-

frieron en agua corriente durante 5 minutos y se agregaron 4 ml de ciclohexanona a cada tubo. Estos se agitaron y se centrifugaron durante 3 minutos. La fase clara superior ciclohexanónica se utilizó para las lecturas. El espectro se registró entre 460 y 600 nm. (Figura 62).

Se graficaron los valores de absorbancia a 545 nm en función de la concentración de ácido siálico (ml de la solución patrón, Figura 63) para determinar la cantidad del mismo presente en las muestras.

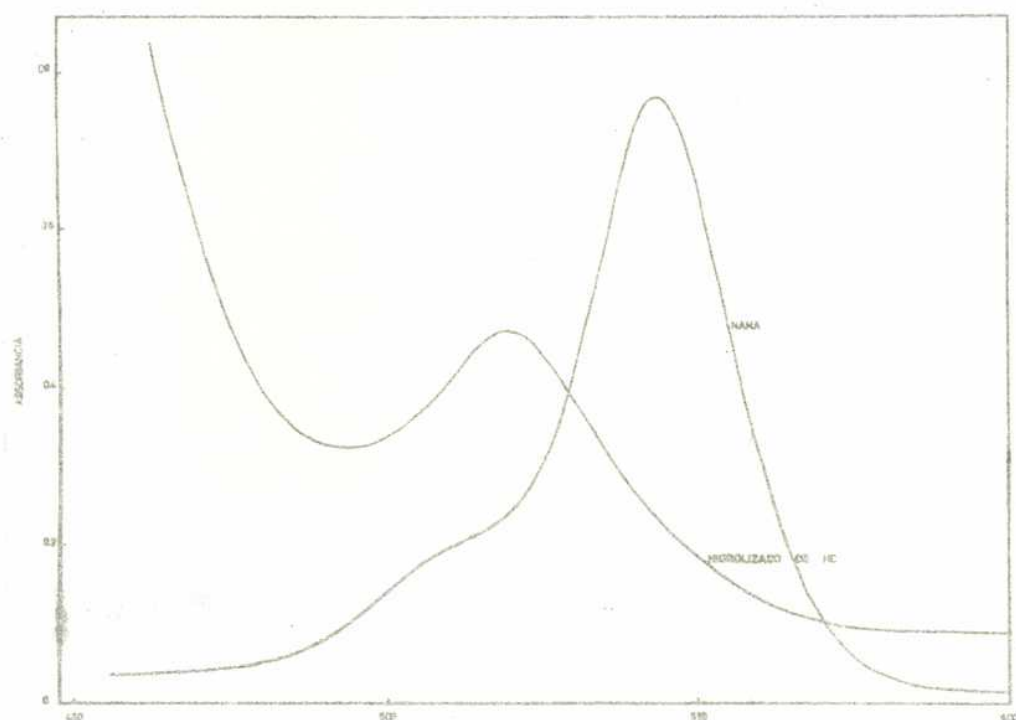


Figura 62. Espectro de absorción del producto obtenido en el método de coloración de ácido siálico.

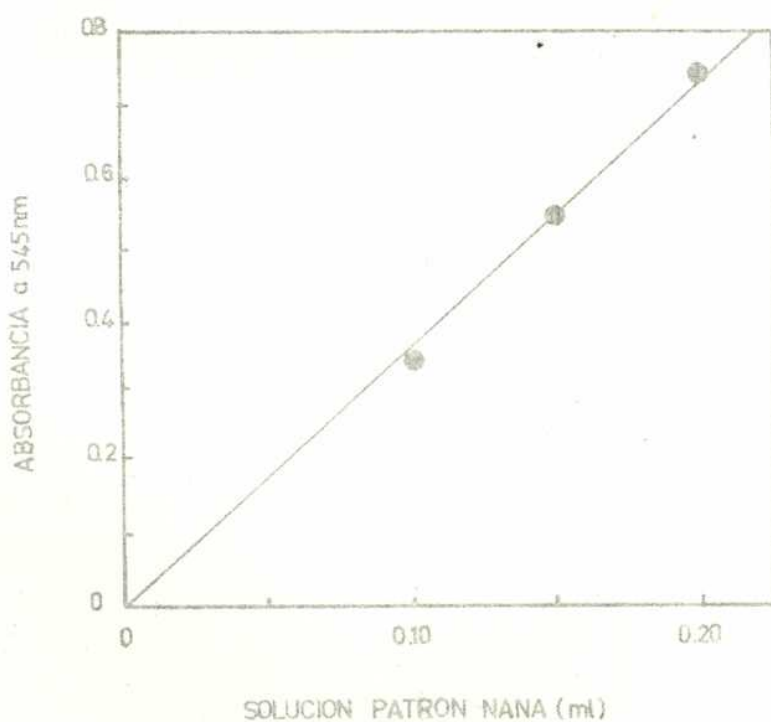


Figura 63. Curva patrón de ácido 8-acetilneuramínico (NANA).

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS TOTALES

Se llevó a cabo con el reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método descrito por Lowry y col. (1951).

Soluciones necesarias

Reactivo A: solución de carbonato de sodio 2 % en solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Reactivo B: solución de sulfato de cobre (II) pentahidrato 0,5 % en solución de tartrato de sodio y potasio 1 %.

Reactivo C: mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B. La solución debe ser desoartada al cabo de 24 horas de preparada.

Reactivo D: reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu (Merck). Se diluye al medio inmediatamente antes de ser usado; la absorbancia de la solución resultante no debe ser mayor de 0,040 medida contra un blanco de agua destilada.

Procedimiento:

A la solución (0,4 ml) conteniendo 25 a 500 μg de proteína por ml, se agregaron 2 ml del reactivo C, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos o más. Se agregaron rápidamente 0,2 ml de reactivo D y se mezclaron dentro de los 2 segundos. Al cabo de 30 minutos o más se midió la absorbancia a 500 nm. Paralelamente se efectuó un blanco con agua destilada.

La cantidad de proteínas se determinó por referencia a las curvas patrón. El procedimiento es aplicable a proteínas en solución o fácilmente solubles en álcali diluido.

Construcción de las curvas patrón

Curva patrón de albúmina: a partir de la solución madre de albúmina de suero bovino (0,5 mg/ml) preparada por disolución en agua, se obtuvieron las soluciones diluidas conteniendo entre 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Curva patrón de gliadina: a partir de la solución madre (1,0 mg/ml) preparada por disolución en agua, se obtuvieron las soluciones diluidas conteniendo entre 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Las curvas patrón se construyeron graficando las absorbancias de las soluciones testigo en función de la concentración (Figura 64).

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AMINOACIDOS COMPONENTES

Las determinaciones se llevaron a cabo sobre los aminoácidos obtenidos por hidrólisis ácida.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS TOTALES

Se llevó a cabo con el reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método descrito por Lowry y col. (1951).

Soluciones necesarias

Reactivo A: solución de carbonato de sodio 2 % en solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Reactivo B: solución de sulfato de cobre (II) pentahidrato 0,5 % en solución de tartrato de sodio y potasio 1 %.

Reactivo C: mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B. La solución debe ser desoartada al cabo de 24 horas de preparada.

Reactivo D: reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu (Merck). Se diluye al medio inmediatamente antes de ser usado; la absorbancia de la solución resultante no debe ser mayor de 0,040 medida contra un blanco de agua destilada.

Procedimiento:

A la solución (0,4 ml) conteniendo 25 a 500 μg de proteína por ml, se agregaron 2 ml del reactivo C, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos o más. Se agregaron rápidamente 0,2 ml de reactivo D y se mezclaron dentro de los 2 segundos. Al cabo de 30 minutos o más se midió la absorbancia a 500 nm. Paralelamente se efectuó un blanco con agua destilada.

La cantidad de proteínas se determinó por referencia a las curvas patrón. El procedimiento es aplicable a proteínas en solución o fácilmente solubles en álcali diluido.

Construcción de las curvas patrón

Curva patrón de albúmina: a partir de la solución madre de albúmina de suero bovino (0,5 mg/ml) preparada por disolución en agua, se obtuvieron las soluciones diluidas conteniendo entre 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Curva patrón de gliadina: a partir de la solución madre (1,0 mg/ml) preparada por disolución en agua, se obtuvieron las soluciones diluidas conteniendo entre 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Las curvas patrón se construyeron graficando las absorbancias de las soluciones testigo en función de la concentración (Figura 64).

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AMINOACIDOS COMPONENTES

Las determinaciones se llevaron a cabo sobre los aminoácidos obtenidos por hidrólisis ácida.

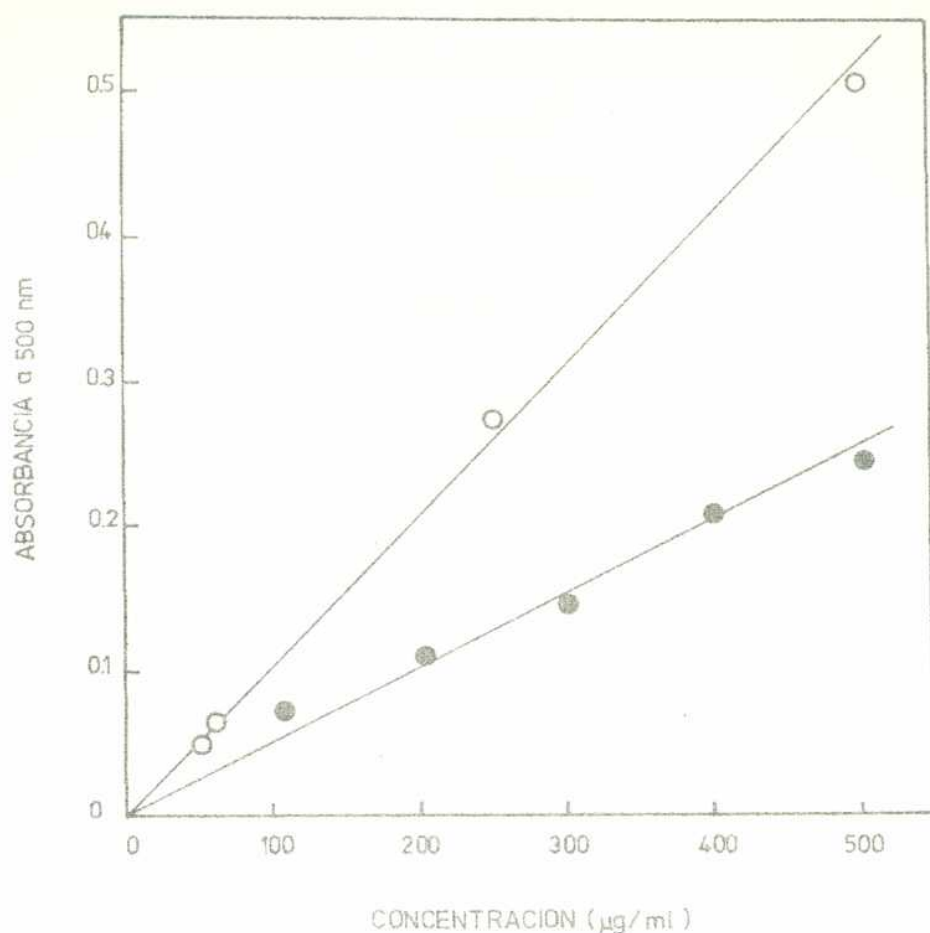


Figura 6%. Curvas patrón de albúmina (o) y gliadina (•).

HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS Y PURIFICACION DEL HIDROLIZADO

Las glicoproteínas (5 a 15 mg, según el contenido en nitrógeno) se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6 N (12 a 20 ml) conteniendo fenol al 1 %, por calentamiento en un tubo cerrado al vacío durante 24 horas a 105°. El hidrolizado se enfrió, se centrifugó el residuo carbonoso y el ácido se eliminó por evaporación al vacío hasta casi sequedad, seguida de tres evaporaciones sucesivas de pequeños volúmenes de agua agregada, después de lo cual se secó en desecador de vacío sobre hidróxido de sodio durante un mínimo de 24 horas. El hidrolizado se tomó luego con agua caliente, se centrifugó el insoluble y se llevó a sequedad. Este procedimiento se repitió dos o tres veces, y finalmente el hidrolizado, disuelto en 0,5 a 1 ml de agua, se purificó por adsorción en una columna de Amberlite IR-120 (H⁺) (30 x 7 mm).

Experiencias previas llevadas a cabo con una mezcla de aminoácidos patrones (arginina, treonina, serina y ácido aspártico, 0,06 miliequivalentes/ml de cada aminoácido), indicaron las condiciones a elegir a los efectos de obtener una recuperación cuantitativa de los mismos, y que son las que figuran a continuación. La columna se lavó con agua (4 ml) para remover los aniones y el material no iónico (hidratos

de carbono). Los aminoácidos se eluyeron con solución de hidróxido de amonio 4 N (15 a 20 ml) usando ninhidrina (revelador g) para determinar el final de la elución (Redfield, 1953). La solución se llevó a sequedad por evaporación al vacío, obteniéndose así la fracción conteniendo los aminoácidos utilizada en los análisis que se detallan a continuación.

D O S A J E C O N E L A N A L I Z A D O R A U T O M A T I C O

La determinación de los aminoácidos estables al ácido en los hidrolizados de glicoproteínas, se llevó a cabo en base al método de Spackman, Stein y Moore (1958) en un Technicon Sequential Multi-Sample Amino Acids Analyser, TMS2 (Technicon Corporation, New York).

Materiales y reactivos necesarios

Se emplearon dos tipos de columnas para cromatografía: una para determinar los aminoácidos ácidos y los neutros (23,0 a 23,5 cm x 5 mm), y otra para los aminoácidos básicos (4,5 a 5,0 cm x 4 mm). Ambas columnas fueron rellenas con Resina Chromo-Beads C-3 (Technicon Corporation, New York).

Soluciones buffer: se utilizaron las siguientes soluciones,

Nº	pH	$\left[\text{Na}^+ \right]$ (N)	citrato (M)	metilcelosolve %
1	3,25	0,2	0,1	6
2	4,25	0,2	0,1	0
3	5,25	0,37	0,1	0

Reactivo de ninhidrina: se usó una mezcla de dos reactivos, ninhidrina al 1 % en metilcelosolve (libre de peróxidos), solución buffer de acetato de sodio 4 N, agua (2:1:4, en volumen), y solución 2 mM de sulfato de hidrazina.

Procedimiento

El hidrolizado se disolvió en 1 ml de solución de ácido clorhídrico 1 % y se sembraron 10 μ l en cada columna. Las soluciones buffer, libres de aire, se impulsaron a velocidad constante a través de las columnas.

En primer término se eluyó la columna de menor longitud usando la solución buffer Nº 3, y seguidamente se eluyó la otra columna haciendo pasar sucesivamente las soluciones buffer Nº 1 y Nº 2.

El eluyente de las columnas se mezcló con la corriente que transportaba el reactivo de ninhidrina, y el color se desarrolló haciendo pasar dicha mezcla a través de un baño de glicerina termostático a 95°. La absorbancia de la solución resultante se midió en forma continua a 570 y 440 nm.

La regeneración de las resinas se llevó a cabo con solución de

hidróxido de sodio 2 N conteniendo EDTA al 1 %.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Temperatura: 60°.

Flujo de las soluciones buffer: 0,50 ml/min.

Flujo del reactivo de ninhidrina: solución de ninhidrina 1 %, 0,80 ml/min.,

solución de sulfato de hidrazina 2 mM, 0,32 ml/min.

Nitrógeno: 0,23 ml/min.

Análisis cuantitativo

Los picos de las curvas de elución se integraron multiplicando la altura del pico por el ancho a la altura media, usando una regla graduada al mm. Para los picos no resueltos totalmente las áreas se calcularon por sucesivas triangulaciones.

El método se calibró mediante el uso de una mezcla sintética patrón de aminoácidos, a partir de la cual se calcularon los valores de las constantes (k), utilizadas para la conversión de áreas en nmoles, características para cada aminoácido (Tabla 59).

Tabla 59. Valores de las constantes (k) utilizadas para la conversión de áreas en nmoles de aminoácidos.^a

Aminoácido	k	Aminoácido	k
aspártico	7,35	isoleucina	6,56
treonina	6,26	leucina	5,20
serina	5,09	tirosina	5,77
glutámico	6,52	fenilalanina	6,00
prolina	27,58	lisina	5,10
glicina	6,58	hidrolisina	4,62
alanina	5,89	arginina	5,59
valina	6,70	hidroxiprolina	57,02 ^b
metionina	6,57		

^a Las absorbancias se midieron a 570 nm, con excepción de prolina e hidroxiprolina que se midieron a 440 nm.

^b Calculada aparte (ver más adelante) con una solución patrón de hidroxiprolina (0,998 nmoles/ μ l).

En base a los datos obtenidos se calcularon los porcentajes relativos al total de los aminoácidos recuperados, y el contenido en aminoácidos se expresó en g de aminoácido anhidro/16 g de nitrógeno (equivalente a 100 g de proteína) utilizando la siguiente expresión:

$$\text{g Aminoácido anh./16 g nitrógeno} = \frac{h_i \times a_i \times k_i \times M_i}{\sum_i h_i \times a_i \times k_i \times M_i} \times 100$$

donde,

h_i : altura del pico (cm).

a_i : ancho del pico a la altura media (cm)

k_i : constante característica para cada aminoácido (nmol/cm²)

M_i : peso molecular del aminoácido en la cadena (peso molecular - 18)

Observaciones

La determinación se llevó a cabo con fines comparativos, razón

por la cual no se estudió el porcentaje de destrucción de aminoácidos en función del tiempo de hidrólisis. Los resultados no fueron corregidos por la destrucción de los aminoácidos bajo las condiciones empleadas (exactitud $\pm 5-10\%$).

La Figura 65 muestra el diagrama de elución obtenido con los aminoácidos componentes de la fracción HC.

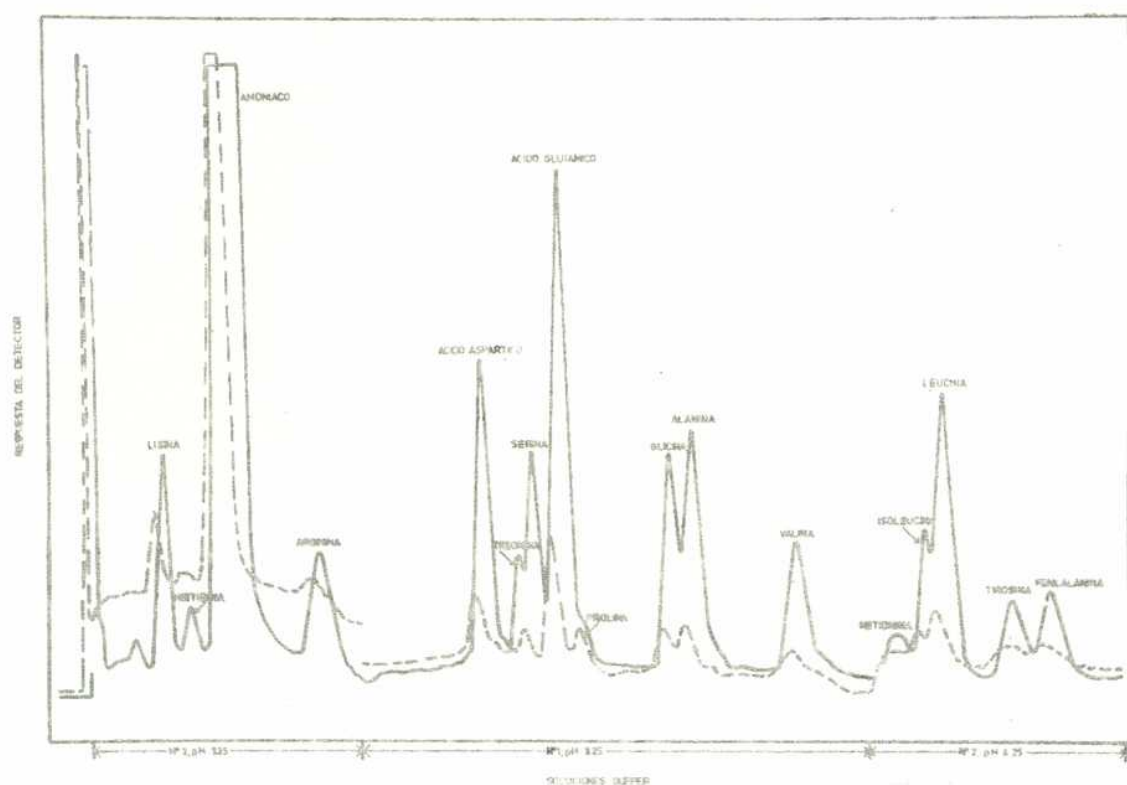


Figura 65. Determinación de la composición en aminoácidos de la fracción HC con el analizador automático TMS 2. (—) Absorbancia a 570 nm y (---) absorbancia a 440 nm.

HIDROXIPIROLINA

METODO ESPECTROFOTOMETRICO

La determinación se realizó utilizando la modificación de Leach (1960) del método de Neuman y Logan (1950).

Soluciones necesarias

Solución de peróxido de hidrógeno 6 %: se preparó por dilución de peróxido de hidrógeno 30 % (peso/volumen), inmediatamente antes de ser usada.

Solución de p-dimetilaminobenzaldehído 5 %: se preparó por disolución del reactivo en n-propanol. La solución es estable guardada en la oscuridad.

Solución patrón de L-hidroxiprolina: se disolvieron 47,7 mg de hidroxiprolina en agua y se diluyeron a 400 ml aproximadamente, se agregaron 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y se llevó a volumen con agua en un matraz aforado de 500 ml (el ácido previene la destrucción micro biológica). A partir de esta solución madre (95,4 $\mu\text{g/ml}$) se prepararon por dilución las soluciones testigo conteniendo 4,77, 9,54 y 14,31 $\mu\text{g/ml}$.

Procedimiento

La determinación se llevó a cabo por triplicado sobre 1 ml de cada solución testigo y de la solución de la muestra (hidrolizado proveniente de 0,8 a 1,3 mg de muestra, según el contenido en proteínas), usando un blanco de agua destilada. A cada tubo se agregó 1 ml de solución de sulfato de cobre 0,05 M y 1 ml de solución de hidróxido de sodio 2,5 N, y se mezclaron. Los tubos se colocaron en un baño de agua termostatzado a 40°; al cabo de 3 minutos se agregó 1 ml de la solución de peróxido de hidrógeno y se agitó el contenido de cada tubo antes de proseguir con el siguiente. A fin de asegurar la posterior destrucción completa del peróxido de hidrógeno, la agitación se efectuó de manera tal que el nivel de la solución dentro del tubo no superara el nivel alcanzado por el agua en el termostato. Los tubos fueron colocados nuevamente en el baño de agua durante 10 minutos con agitación ocasional. Se enfriaron con agua corriente y se agregaron 4 ml de la solución de ácido sulfúrico 3 N seguidos de 2 ml de la solución de p-dimetilaminobenzaldehído, mezclando el contenido antes de cada adición. Se taparon los tubos con bolitas de vidrio y se calentaron en un baño de agua termostatzado a 70° durante 16 minutos. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se agitaron. Se midió la absorbancia a 555 nm.

Para el cálculo se promediaron los valores obtenidos para cada solución testigo y se graficaron en función de la concentración de hidroxiprolina (Figura 66).

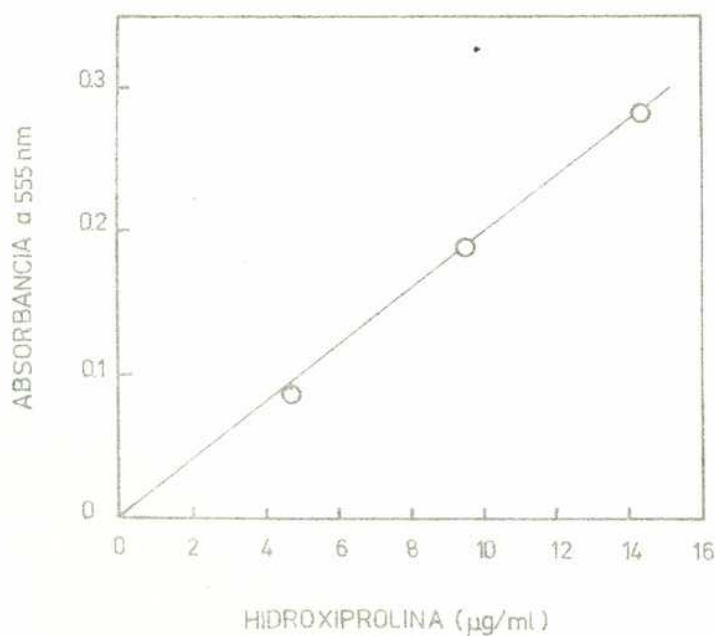


Figura 66. Curva patrón de L-hidroxiprolina.

DOSAJE CON EL ANALIZADOR AUTOMATICO

En las condiciones de operación utilizadas con el TMS2 para la

determinación del resto de los aminoácidos, la hidroxiprolina no es resuelta del ácido aspártico (Spackman y col., 1958), razón por la cual, dado que la hidroxiprolina presenta un máximo de absorción a 440 nm, se estimó el porcentaje aproximado de la misma en base a la siguiente expresión:

$$H = \frac{T-A}{4,74}$$

donde,

- H: área correspondiente a hidroxiprolina a 440 nm
- T: área total a 440 nm (hidroxiprolina más ácido aspártico)
- A: área correspondiente al ácido aspártico a 570 nm (se desprecia hidroxiprolina)
- 4,74: relación de áreas para el ácido aspártico a 570 y 440 nm calculada con soluciones patrón de ácido aspártico a diferentes concentraciones.

Con el valor de H y utilizando la constante k calculada para hidroxiprolina (k= 57,02), se determinó el porcentaje de la misma en las muestras.

H I D R O X I L I S I N A

La determinación se realizó según el método descrito por Blumenkrautz y Prockop (1971), debido a que en las condiciones de operación del TMS2 no existe suficiente resolución.

Soluciones necesarias

Solución buffer de citrato-fosfato: se preparó mezclando 154 ml de solución de ácido cítrico 0,15 M con 346 ml de solución de fosfato dibásico de sodio 0,6 M. El pH de la solución resultante es de 7.

Solución patrón de δ -hidroxilisina: se preparó por disolución de δ -hidroxilisina (0,8 μ g/ml) en solución de hidróxido de sodio 0,02 N.

Solución de periodato: se utilizó una solución de metaperiodato de sodio 0,3 M.

Reactivo de Ehrlich: se agregaron 15 ml de isobutanol a 4 g de p-dimetilaminobenzaldehído (recristalizado de etanol-agua), seguido de 4,5 ml de ácido perclórico. La solución es estable por varias semanas guardada en heladera en la oscuridad.

Procedimiento

La fracción de aminoácidos proveniente de la hidrólisis de 2,59 mg de muestra, se tomaron con 0,4 ml de hidróxido de sodio 0,02 N y se sembraron de 100 a 200 μ l sobre una placa preparativa de Silica-gel. Simultáneamente se cromatografió la solución patrón de hidroxilisina, sembrando cantidades tales que la concentración de aminoácido fuera de 10 a 32 μ g, y 20 μ l de una solución conteniendo 15 μ g de hidroxilisina más 30 μ g de prolina en hidróxido de sodio 0,02 N. El

sistema se desarrolló con el solvente 6 durante 3 horas. La sección de la placa conteniendo ambos testigos se reveló con el reactivo g, a fin de localizar la posición cromatográfica de la hidroxilisina (R_f 0,03) y asegurar su separación de la prolina (R_f 0,30). Se separó el área del gel conteniendo la hidroxilisina en la muestra y en los testigos, y se extrajeron con 8 ml de solución buffer (4 x 2 ml).

La reacción se llevó a cabo agregando al tubo de ensayo con los 8 ml de solución, 0,3 ml de la solución de periodato y agitando. Se agregaron 3,0 ml de la solución de extracción (tolueno, isobutanol, n-propanol; 5:5:2, en volumen) y se mezclaron las fases. Se recubrieron los tubos con papel de aluminio y se agitaron durante 20 minutos. La separación de las fases se obtuvo por centrifugación a baja velocidad durante 10 minutos. Se pipetearon 2 ml exactos de la fase orgánica a un tubo de ensayo, se agregaron 0,5 ml del reactivo de Ehrlich y se agitó vigorosamente. Al cabo de 15 minutos a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 565 nm y se graficó la absorbancia de los tubos testigo en función de su concentración (Figura 67).

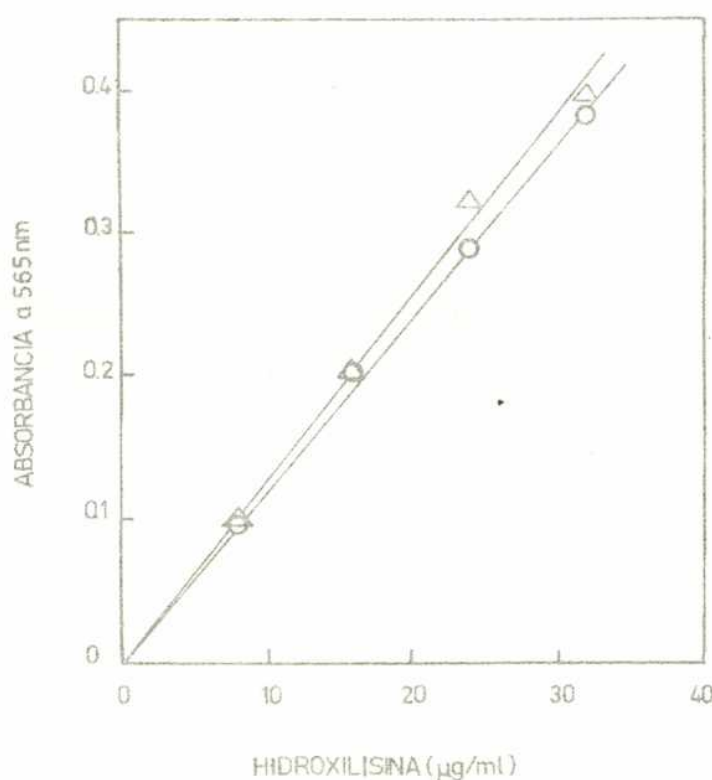


Figura 67. Curva patrón de δ -hidroxilisina. Soluciones de hidroxilisina original (o); soluciones de hidroxilisina obtenidas luego de la cromatografía en placa delgada. (Δ).

TIROSINA Y TRIPTOFANO

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Bencze y Schmid (1957), que está basado en dos propiedades distintas de las curvas de absorción: la pendiente de la tangente a los dos máximos de absorción característicos y la absorbancia máxima son funciones directas de la relación y la cantidad de tirosina y triptofano.

Soluciones necesarias

Soluciones patrón de aminoácidos testigo: a partir de la solución madre (0,01 M) preparada por disolución del aminoácido en hidróxido de sodio 0,1 N, se obtuvo la solución testigo (0,10 mM) por dilución con hidróxido de sodio. Los aminoácidos utilizados fueron tirosina y triptofano.

Soluciones testigo mezcla: a partir de las soluciones 0,10 mM se prepararon soluciones mezcla de tirosina y triptofano de las siguientes relaciones molares 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0.

Procedimiento

Las soluciones de glicoproteínas en hidróxido de sodio 0,1 N (1 mg/ml) se prepararon inmediatamente antes de ser analizadas.

Se registraron los espectros de absorción de las soluciones testigo y de las muestras entre 265 y 325 nm (Figura 68) y se trazaron las tangentes a los dos máximos de absorción (alrededor de 282 nm para triptofano y de 292 nm para tirosina ionizada). Para aquellas muestras en las que la relación molar de tirosina a triptofano difiere considerablemente del valor 1, y por lo tanto el error en el trazado de la tangente es máximo, se registraron las absorbancias de soluciones mezcla de glicoproteína (1 mg/ml) y triptofano (0,10 mM) 1:1 en volumen.

Cálculos

Del gráfico de absorbancia en función de la longitud de onda (Figura 68) se obtuvieron, para cada solución, los valores de la pendiente (p) de la tangente a los dos máximos característicos, y los de la absorbancia máxima (A_{\max}). Para los cálculos se definió el valor S ($S = \frac{p \times 10^3}{A_{\max}}$) y los coeficientes de extinción $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ se calcularon con la siguiente ecuación:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = E_M \times \frac{10(1+R)}{204 + 181 R}$$

donde,

E_M : coeficiente de extinción molar ($E_M = A_{\max}/c$, c : concentración molar de tirosina más triptofano)

R : relación molar de tirosina a triptofano

Con los datos obtenidos para las soluciones testigo (Tabla 60) se graficaron los valores de S y del coeficiente $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ en función de las relaciones molares R (Figura 69). A partir del valor de S calculado para las soluciones de las muestras, se obtuvieron por interpolación la relación molar R y el coeficiente de extinción $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$, y se determinó el contenido en tirosina y triptofano de las mismas (Tabla 61) mediante las siguientes expresiones:

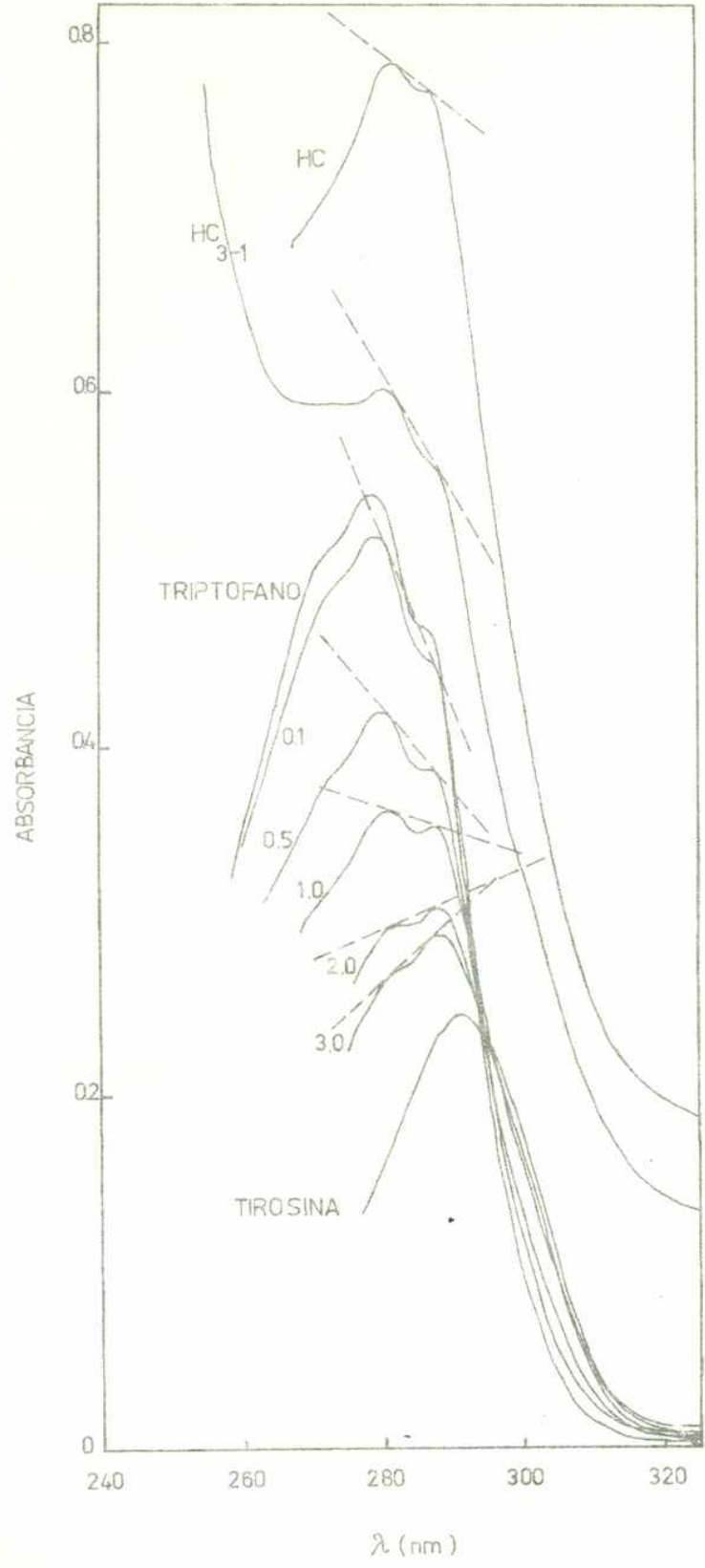


Figura 68. Espectro de absorción ultravioleta de las soluciones testigo de tirosina y triptofano (R = 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0) y de las soluciones de las fracciones HC y HC₃₋₁.

^a Ver nota en Tabla 61.

$$\begin{aligned} \% \text{ Tirosina} &= \frac{181 \times A_{\text{max}} \times 100}{385 \times E_{1 \text{ cm}}^{1\%} \times m} \\ \% \text{ Triptofano} &= \frac{(A_{\text{max}} - r E_{1 \text{ cm}}^{1\%}) \times 100}{E_{1 \text{ cm}}^{1\%} \times m} - \% \text{ Tirosina} \end{aligned}$$

donde,

m: concentración de la muestra (g/100 ml)

r: concentración de triptofano agregado (g/100 ml)

Tabla 60. Valores obtenidos con las soluciones testigo de tirosina y triptofano.

R	$p \times 10^3$	A_{\max}	S	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
Triptofano	0,538	264
0,1	-9,8	0,515	-19,0	255
0,5	-4,7	0,416	-11,3	212
1,0	-1,6	0,362	-4,4	188
2,0	+2,0	0,307	+6,5	163
3,0	+3,5	0,291	+12,0	156
Tirosina	0,244	134

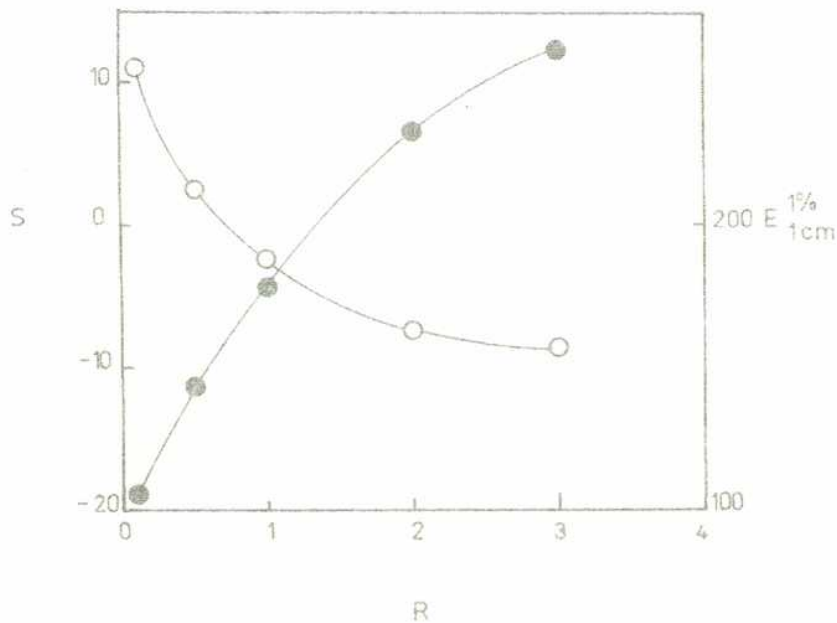


Figura 69. Representación de los valores obtenidos con las soluciones testigo de tirosina y triptofano. (•) $S=f(R)$; (○) $E_{1\%}^{1\text{cm}}=f(R)$.

Tabla 61. Determinación del contenido en tirosina y triptofano de las fracciones HC y HC₃₋₁.

Fracción	A_{\max}^a	S	R	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	Tirosina (%)	Triptofano (%)
HC	0,785	-4,1	1,0	188	3,8	2,4
HC ₃₋₁	0,597	-11,2	0,5	212	1,6	1,8

^a Se registraron en presencia de solución de triptofano 0,10 mM (2 ml).

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN LIGNINA

Se llevó a cabo sobre materiales solubles en agua. Las muestras (0,5 a 2 mg) se disolvieron en agua (2 a 10 ml) y se registraron

los espectros de absorción ultravioleta entre 245 y 360 nm y se midieron las absorbancias a 280 nm en celdas de 1 cm.

Cálculos

Los valores de absorción (A) se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$A = \frac{D.O.M - D.O.B}{c} \quad \text{cm}^{-1} \text{lg}^{-1}$$

donde,

D.O.M: densidad óptica de la muestra

D.O.B: densidad óptica del blanco

c: concentración de la muestra en la solución final (g/l)

Con los valores de absorción se calculó el porcentaje de lignina en las muestras, utilizando la absorptividad absoluta de lignina patrón (23,5, promedio del valor obtenido para maderas blandas (23,3) y del obtenido para maderas duras (23,6) por Johnson y col. (1961)) en la siguiente expresión:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{A \times 100}{23,5} \quad (\text{ecuación 1})$$

o mediante el uso de las siguientes ecuaciones de regresión:

a) Para legumbres (Morrison, 1972 b)

$$\% \text{ Lignina} = 5,12 A - 0,74 \quad (\text{ecuación 2})$$

La ecuación fue obtenida de analizar el contenido de 14 muestras de cenizas conocidas por el método de Morrison (1972 b) y por el método de Waite y col. (1964).

b) Para pastos (Morrison, 1972 a)

Ecuación obtenida en la misma forma para 55 muestras de contenido en cenizas conocido:

$$\% \text{ Lignina} = 3,36 A - 1,11 \quad (\text{ecuación 3})$$

Si no se conoce el contenido en cenizas, puede aplicarse la siguiente ecuación de regresión aproximada:

$$\% \text{ Lignina} = 3,37 A - 1,05 \quad (\text{ecuación 4})$$

Ecuación deducida para las muestras de holocelulosas preparadas a partir de 12 muestras de pastos, de contenido en cenizas conocido:

$$\% \text{ Lignina} = 2,47 A - 0,36 \quad (\text{ecuación 5})$$

Los resultados obtenidos con las fracciones analizadas figuran en la Tabla 62. La fracción HC_1 dio valores dentro del margen de error del método ($\leq 1\%$).

D E T E R M I N A C I O N D E L C O N T E N I D O E N L I P I D O S

Se llevó a cabo por el método descrito por Folch y col. (1957)

Tabla 62. Determinación del contenido en lignina de las fracciones HC y HC₁.

Fracción	A (1/g.cm)	Lignina (%) ^a				
		1	2	3	4	5
HC	0,679	2,9	2,7	1,2	1,2	1,3
HC ₁	0,276	1,2	0,7	0,2	0,1	0,3

^a Los valores se calcularon con las correspondientes ecuaciones.

y adaptado por Vance y Sweeley (1967).

Se suspendieron 0,5 g de muestra en 30 ml de metanol, se disgregaron y se agregaron 60 ml de cloroformo. La mezcla se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 25 minutos, se filtró sobre papel de filtro previamente lavado con cloroformo, metanol 2:1 (en vol.) y el residuo se lavó con 10 ml de cloroformo, metanol 2:1. Se reunieron los extractos (100 ml), se mezclaron con 20 ml de agua destilada libre de aire y la mezcla bifásica se dejó en refrigerador durante una noche para separar ambas capas.

El residuo se extrajo nuevamente con 45 ml de cloroformo, metanol 2:1 a reflujo durante 2 horas. El extracto se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el residuo remanente se lavó con 5 ml de cloroformo, metanol 2:1. Se reunieron los extractos (45 ml), se mezclaron con 32,5 ml de agua y para la separación de las capas se procedió en la forma antes indicada.

Las capas acuosas metanólicas (capa superior) se removieron por succión y el remanente de las mismas se extrajo por repetidos lavados con pequeñas cantidades de cloroformo, metanol, agua 2:48:47 (en vol.), cuidando de no mezclar con la capa inferior. El líquido de lavado residual que queda como una ligera capa superior, se homogeneizó con la inferior por agregado de metanol. Se reunieron las capas inferiores conteniendo los lípidos totales extraídos y purificados, y se llevaron a sequedad en un balón tarado. Las capas acuosas metanólicas se reunieron, concentraron y liofilizaron, y el residuo insoluble se suspendió en agua y se liofilizó.

C A R A C T E R I S T I C A S D E L M A T E R I A L

Se utilizaron vainas maduras de Gleditsia triacanthos recolectadas en el Parque Pereyra Iraola, Provincia de Buenos Aires. De estas vainas se obtuvieron las semillas, libres de alteraciones y selecciona

das según su tamaño, empleadas en la investigación.

El aislamiento de las distintas fracciones se llevó a cabo sobre semillas molidas en un molinillo Wiley (malla 20), inmediatamente antes de la extracción.

SEPARACION DE LA SEMILLA EN SUS DISTINTAS PARTES

Se realizó pesando una cantidad dada de semillas enteras y calentándolas con agua a ebullición hasta que, por hinchado de las mismas, se produjo la ruptura de la cubierta (10 a 15 minutos). Las semillas se colocaron en alcohol para evitar una posterior solubilización del mucílago y las proteínas, y el endosperma se separó manualmente de la testa y del embrión. Las distintas partes se llevaron a seco de etanol y se determinaron los porcentajes aproximados de las mismas en la semilla, así como también su contenido en nitrógeno (Tabla 19).

EXTRACCION Y PURIFICACION
DE LAS FRACCIONES

NOMENCLATURA

Las distintas fracciones obtenidas en los procedimientos de extracción (Figura 20), se designaron en la forma indicada en la Tabla 63.

Tabla 63. Nomenclatura de las fracciones estudiadas.

FRACCION	DESIGNACION
Galactomanano extraído a temperatura ambiente	G _m
Galactomanano extraído a 50°	G _{m50}
Galactomanano extraído directamente a 50°	G _{mt}
Polisacáridos extraídos con solución de hidróxido de potasio 10 % (Hemicelulosas)	H
Hemicelulosa A (precipitada al neutralizar por diálisis)	HA
Hemicelulosa B (precipitada con tres volúmenes de etanol)	HB
Hemicelulosa C (soluble remanente)	HC
Polisacáridos extraídos con solución de oxalato de amonio 1 % (Sustancias pécticas)	P
Sustancias pécticas A (precipitadas al dializar)	PA
Sustancias pécticas B (precipitadas a pH 4 con dos volúmenes de acetona)	PB
Sustancias pécticas C (soluble remanente)	PC
Polisacáridos extraídos con solución de urea 7 M	U
Residuo remanente de extraer, sucesivamente, G _m y G _{m50}	S _g
Residuo remanente de extraer, sucesivamente, G _m , G _{m50} y H	S _h
Residuo remanente de extraer, sucesivamente, G _m , G _{m50} y P	S _p
Residuo remanente de extraer, sucesivamente, G _m , G _{m50} , H y P	S _{hp}
Residuo remanente de extraer, sucesivamente, G _m , G _{m50} , P y H	S _{ph}

GALACTOMANANOS

EXTRACCION
PROCEDIMIENTO 1

Extracción con agua a temperatura ambiente

Las semillas molidas (118,0 g) se extrajeron durante 72 horas con agua destilada (7 l), empleando m-toluidina como germicida. El extracto acuoso se separó por centrifugación y el residuo insoluble se extrajo nuevamente en condiciones análogas durante 48 horas con 2,5 l de agua destilada. Se separó el segundo extracto acuoso y el residuo insoluble se extrajo en la misma forma con 1 l de agua durante 24 horas.

Para el aislamiento del galactomanano (fracción G_m), se reunieron los dos primeros extractos acuosos y se agregó etanol, lentamente y con agitación vigorosa, hasta una concentración del 10 % (experiencias previas, llevadas a cabo sobre una alícuota, indicaron que el galactomanano no precipita a esa concentración). Al cabo de 24 horas de agitación se separó el residuo insoluble formado por restos del material extraído, y se descartó. Se agregó etanol al líquido sobrenadante hasta una concentración del 31,8 % (límite máximo de precipitación determinado previamente sobre una alícuota). El galactomanano precipita en esas condiciones como fibras blancas. Se decantaron las aguas madres y sobre una alícuota se incrementó la concentración de etanol hasta un 70 %, obteniéndose un precipitado despreciable. El galactomanano obtenido se prensó entre hojas de papel de filtro y se dejó en etanol; por secado se obtuvieron 23,0 g de producto (fracción G_m : rendimiento 19,5 %, $[\alpha]_D + 25,8$ (c 0,1, agua), nitrógeno (dos determinaciones) 1,7 %).

Por tratamiento del tercer extracto acuoso con etanol, en la forma descrita para los dos primeros, se observó una escasa precipitación aún llevando al 60 % (rendimiento 0,1 %), razón por la cual este producto fue descartado en la obtención de la fracción G_m , y la etapa correspondiente suprimida en otros aislamientos.

Por otra parte, las extracciones exhaustivas del galactomanano soluble en agua a temperatura ambiente llevadas a cabo con el objeto de eliminar este producto de la semilla, se realizaron en general repitiendo el procedimiento hasta no observar precipitación cuando el extracto acuoso es volcado sobre dos volúmenes de etanol (tres a cuatro extracciones sucesivas).

Extracción con agua a 50°

El residuo proveniente de la extracción exhaustiva de la fracción G_m , se extrajo durante 24 horas con agua destilada (1 l) a 50° en presencia de m-toluidina. Se separó por centrifugación el extracto acuoso y se llevaron a cabo dos extracciones más en la misma forma. Se reunieron los dos primeros extractos y se enfriaron a temperatura am-

biente. La precipitación del galactomanano (fracción G_{m50}) se realizó en la forma indicada para la fracción G_m , obteniéndose 3,4 g de producto (fracción G_{m50} : rendimiento 2,9 %, $\left[\begin{smallmatrix} \text{X} \\ \text{D} \end{smallmatrix} \right] + 21,8$ (o 0,09, agua) y + 19,8 (o 0,1, ClNa 0,1 M), nitrógeno 2,4 %). Incrementando la concentración en etanol al 60 % se produjo un precipitado despreciable.

El tercer extracto acuoso tratado en forma análoga a lo indicado para la extracción a temperatura ambiente, dio un rendimiento del 0,2 %.

Las extracciones exhaustivas de la fracción G_{m50} se efectuaron de la manera descripta para la fracción G_m , pero extrayendo a 50°.

Por secado del residuo insoluble remanente (fracción S_g) de la extracción exhaustiva de los galactomananos (fracciones G_m y G_{m50}) se obtuvieron 52,0 g (44,0 %).

PROCEDIMIENTO 2

Extracción directa con agua a 50°

Las semillas molidas (25,0 g) se extrajeron durante 24 horas con agua destilada (1,25 l) a 50°, en presencia de m-toluidina. El extracto acuoso se separó por centrifugación y el residuo insoluble se extrajo nuevamente en la misma forma. Se reunieron ambos extractos y se enfriaron a temperatura ambiente. La precipitación del galactomanano solubilizado directamente en agua a 50° (fracción G_{mt}) se llevó a cabo según lo indicado para la fracción G_m , pero con un límite máximo de precipitación del 35 % en etanol, obteniéndose 3,9 g de producto (fracción G_{mt} : rendimiento 15,7 %, $\left[\begin{smallmatrix} \text{X} \\ \text{D} \end{smallmatrix} \right] + 37,8$ (o 0,05, agua) y + 31,3 (o 0,07, ClNa 0,1 M), nitrógeno 1,9 %).

Se realizó una tercera extracción del residuo insoluble remanente, con lo que se obtuvo, precipitando con una concentración de etanol de hasta el 37,5 %, un producto despreciable.

PURIFICACION

Precipitación fraccionada de la fracción G_m

La fracción G_m (2,0 g) se disolvió en agua destilada (1 l) por agitación a temperatura ambiente durante 24 horas (no se observó residuo insoluble). Se agregó etanol lentamente y con agitación hasta una concentración del 10 % sin que se produjera precipitación. Se continuó el agregado de etanol hasta una concentración del 20 % y se separó la fracción precipitada (G_{m20}). A la solución sobrenadante se agregó etanol hasta una concentración del 25 % y la fracción precipitada (G_{m25}) se separó. Se repitió el procedimiento llevando a una concentración de etanol del 30 %, con lo que se obtuvo la fracción G_{m30} . Sobre la solución sobrenadante se incrementó gradualmente la concentración de etanol.

nol hasta un 60 % sin que se observara la formación de un nuevo precipitado. Esta solución se concentró y liofilizó (fracción G_{ms}), y las fracciones precipitadas se llevaron a seco.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 23 (Figuras 18 y 19).

Subfraccionamiento de la fracción G_{m15}

La fracción G_{m15} (24 mg, nitrógeno 7,4 %) se suspendió en agua (50 ml) y se agitó durante 16 horas. Se separó por centrifugación el residuo insoluble, se ~~res~~suspendió en agua y se liofilizó (fracción G_{m15i} : nitrógeno 10,0 %). El sobrenadante se concentró y liofilizó (fracción G_{m15s} : nitrógeno 2,4 %).

Extracción de los galactomananos del endosperma

Se llevó a cabo por el Procedimiento 1.

El material molido (33,0 g) se extrajo a temperatura ambiente durante 24 horas con agua destilada (4 l). El extracto acuoso se separó por centrifugación y sobre el residuo insoluble se efectuaron dos extracciones más en condiciones análogas (1 l de agua destilada durante 72 horas, y 700 ml durante 24 horas). Se reunieron los extractos acuosos y se concentraron a 1,27 l. Se agregó etanol, lentamente y con agitación vigorosa, hasta una concentración del 10 %. Al cabo de 8 horas de agitación se separó el residuo insoluble (despreciable) y se descartó. Al sobrenadante se agregó etanol, lentamente y con agitación, hasta precipitación. Se separó la fracción precipitada y se repitió la precipitación con concentraciones crecientes de etanol. La solución remanente se concentró y se dializó (24 horas) y finalmente se liofilizó. Las fracciones precipitadas se llevaron a seco. Los resultados figuran en la Tabla 24.

El residuo proveniente de la extracción a temperatura ambiente, se extrajo durante 48 horas con agua destilada (1 l) a 50 °C. Se separó el extracto acuoso y se llevaron a cabo dos extracciones más en la misma forma. Se reunieron los dos primeros extractos, se enfriaron a temperatura ambiente y la precipitación del galactomanano (Tabla 24) se realizó en la forma antes indicada. El tercer extracto acuoso, tratado en forma análoga, dio (Tabla 24) muy bajo rendimiento.

Por secado del residuo insoluble remanente se obtuvieron 5,37 g. Sobre 2,0 g del mismo se efectuó la extracción con agua destilada (150 ml) a reflujo durante 24 horas. Se separó el extracto acuoso, se enfrió a temperatura ambiente y se procedió a la precipitación del galactomanano en la misma forma (Tabla 24).

Sobre otros 2,1 g de este residuo se llevó a cabo la extracción con solución de hidróxido de potasio 10 % (160 ml) durante 24 ho-

ras. Se separó el extracto aloalino, se filtró al vacío a través de papel de fibra de vidrio, se dializó hasta neutralidad (38 horas) sin que se observara la aparición de precipitado. La solución se concentró a 115 ml y se procedió a la precipitación del galactomanano en la forma antes indicada.

H E M I C E L U L O S A S

E X T R A C C I O N

PROCEDIMIENTO 1

El residuo proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos (fracción S_g) de 118,0 g de semillas, se extrajo durante 24 horas con solución de hidróxido de potasio 10 % (1 l). Se separó por centrifugación el extracto alcalino y se filtró el sobrenadante al vacío a través de papel de fibra de vidrio. El procedimiento de extracción se repitió dos veces más, al cabo de las cuales el residuo insoluble remanente (fracción S_h) se lavó con agua destilada hasta neutralidad y se secó (fracción S_h : rendimiento 16,2 %, nitrógeno 0,85 %). Las aguas de lavado se reunieron con el último extracto alcalino.

Cada uno de los tres extractos alcalinos se dializó hasta neutralidad (mínimo 72 horas) y el precipitado obtenido en esta forma (fracción HA) se separó y se secó.

Las aguas madres de la fracción HA se concentraron a una quinta parte de su volumen y se volcaron con agitación sobre tres volúmenes de etanol. El precipitado (fracción HB) se separó y se secó.

Las aguas madres de la fracción HB se concentraron y liofilizaron, obteniéndose así la fracción HC.

Los porcentajes obtenidos figuran en la Tabla 25 y el contenido en nitrógeno de las fracciones, en la Tabla 26.

Se extrajo la fracción S_h una vez más en las condiciones indicadas y se obtuvieron las fracciones HA, HB y HC con un rendimiento del 0,04 %, 1,3 % y 0,08 % respectivamente, razón por la cual la cuarta extracción alcalina fue suprimida en otros aislamientos.

PROCEDIMIENTO 2

La extracción de las hemicelulosas y la neutralización de los extractos alcalinos se realizaron en la forma indicada para el Procedimiento 1.

Para la precipitación de la fracción HA se siguió el tratamiento propuesto por Blake y col. (1971). Se concentró la suspensión conteniendo las hemicelulosas a una quinta parte de su volumen, se calentó en baño de agua a ebullición durante 10 minutos y se dejó a 30° durante 5 horas. Una vez separada la fracción HA, se obtuvieron las fraccio

nes HB y HC según lo descripto en el Procedimiento 1.

Los porcentajes obtenidos figuran en la Tabla 25.

P U R I F I C A C I O N

DETERMINACION DE LA HOMOGENEIDAD DE LA FRACCION HA POR DISOLUCION FRACCIONADA CON SOLUCIONES DE HIDROXIDO DE POTASIO

I) La fracción HA (0,150 g, nitrógeno 2,9 %, metoxilo 0,7 %) se suspendió en solución de hidróxido de potasio 10 % (30 ml), y se agitó hasta disolución constante. El residuo insoluble (fracción HA_i) se separó, se lavó con agua destilada hasta eliminar el álcali y se secó. El extracto alcalino se dializó hasta neutralidad, se concentró y liofilizó, obteniéndose la fracción HA₁₀.

Los resultados (subfraccionamiento 1) figuran en la Tabla 31.

II) Se suspendieron 3,0 g de la fracción HA (idénticas propiedades generales) en solución de hidróxido de potasio 10 % (600 ml) y se agitaron durante 30 minutos. Se separó el residuo insoluble (fracción HA_i), se lavó y se secó.

La determinación se efectuó por duplicado (subfraccionamientos 3 y 4). El extracto alcalino se dializó hasta neutralidad sin que se observe, en el caso del subfraccionamiento 3, la aparición de precipitado. La solución conteniendo las hemicelulosas se dejó a temperatura ambiente y al cabo de un mes se obtuvo un precipitado finamente dividido no separable. Después de 11 meses se recuperaron las fracciones HA, HB y HC utilizando el Procedimiento 2.

Los porcentajes respectivos figuran en la Tabla 32.

III) La fracción HA (1,0 g, idénticas propiedades generales) se suspendió en solución de hidróxido de potasio 10 % (200 ml) y se agitó durante 24 horas. El extracto alcalino (fracción HA₁₀) se separó por centrifugación y el residuo insoluble se extrajo con solución de hidróxido de potasio 15 %, obteniéndose el extracto alcalino conteniendo la fracción HA₁₅. Se separó éste por centrifugación y el procedimiento se repitió con soluciones de hidróxido de potasio de concentración creciente para obtener las fracciones HA₂₀, HA₂₅ y HA₃₀ por disolución a la concentración de álcali indicada por el subíndice correspondiente. Debido a que las soluciones mostraron tendencia a colorearse, los tiempos de extracción se redujeron hasta un tiempo final (fracción HA₃₀) de 1 hora. El residuo insoluble remanente (fracción HA_i) se lavó y se secó.

Cada uno de los cinco extractos alcalinos fueron dializados hasta neutralidad, obteniéndose sólo un precipitado significativo en el caso de las fracciones HA₁₅ y HA₂₀. Estos se separaron y se secaron

(fracciones HA_{15i} y HA_{20i}, respectivamente). Las soluciones remanentes se concentraron y liofilizaron.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 33.

DETERMINACION DE LA HOMOGENEIDAD DE LA FRACCION HB

La fracción HB (0,5 g, $[\alpha]_D^{25} -32,5$ (c 0,2, NaOH 0,1 N), nitrógeno 7,5, metoxilo 0,6 %) se suspendió en agua destilada (50 ml), se agitó sobre baño de agua helada y se ajustó a pH 5 con solución de ácido acético al 50 %. El residuo insoluble (fracción HB₁) se separó y se secó.

El extracto ácido (50 ml) se llevó a pH 3 en las mismas condiciones y el precipitado obtenido (fracción HB₂) se separó y se secó.

Las aguas madres de la fracción HB₂ (50 ml) se volcaron sobre tres volúmenes de etanol, bajo las condiciones antes indicadas, y el material precipitado (fracción HB₃) se separó y se secó.

El sobrenadante de la fracción HB₃ se concentró y liofilizó (fracción HB₄). Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 40.

FRACCIONAMIENTO DE HB POR PRECIPITACION CON IODO EN PRESENCIA DE CLORURO DE CALCIO

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Gaillard (1961).

La fracción HB (1,0 g, idénticas propiedades generales) se suspendió en solución de cloruro de calcio 41,2 % (100 ml) y se agitó durante 6 horas. Se separó el residuo insoluble (fracción HB_i), se lavó con agua y se secó. Por adición de 2 ml de solución de iodo (3 g de iodo y 4 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua) al sobrenadante, se obtuvo un precipitado marrón oscuro (fracción HB₁) que se separó por centrifugación.

Se destruyó el exceso de iodo de la solución remanente por agregado de tiosulfato de sodio y se dializó contra agua corriente (experiencias previas indicaron una contaminación con sales de los polisacáridos obtenidos, superior al 100 % para las fracciones HB_{ri} y HB_{rs}, si no se someten a diálisis las soluciones correspondientes). La solución se concentró a un tercio de su volumen y se volcó sobre tres volúmenes de etanol, sobre baño de agua helada. El precipitado obtenido (fracción HB_{ri}) se separó y se secó. Las aguas madres de la fracción HB_{ri} se concentraron y liofilizaron (fracción HB_{rs}).

La fracción HB₁ se suspendió en agua (75 ml) y se agitó hasta disolución completa. Se destruyó el exceso de iodo con tiosulfato de sodio y la solución se dializó contra agua corriente, se concentró a la mitad de su volumen y se volcó sobre tres volúmenes de etanol, sobre baño de agua helada (fracción HB_{1i}). Las aguas madres se concentraron y liofilizaron (fracción HB_{1s}).

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 41.

SUBFRACCIONAMIENTOS DE LA FRACCION HC (Figura 53)

Se llevaron a cabo por cromatografía sobre geles, utilizando el procedimiento descrito en las técnicas generales.

Cromatografías analíticas

La fracción HC (60 mg, nitrógeno (dos determinaciones) 11,1 %, cenizas 10,4 %) se suspendió en el solvente de elución (2 ml) y se calentó en baño de agua a ebullición hasta disolución. El residuo insoluble (fracción HC₁) se separó y se secó, y la solución sobrenadante se sembró sobre la columna de fraccionamiento (Sephadex G-100). Se reunieron las fracciones correspondientes en tres fracciones mayores (HC₁, HC₂ y HC₃), que se concentraron y liofilizaron.

Los resultados obtenidos empleando como eluyente agua y solución de cloruro de sodio 0,05 M están indicados en las Figuras 38 y 39.

Cromatografías preparativas

Se efectuaron dos fraccionamientos equivalentes sobre Sephadex G-100 usando solución de cloruro de sodio 0,05 M como eluyente.

La fracción HC (1,0 g, $\left[\text{C} \right]_{\text{D}}$ -14,3 (c 0,2, NaOH 0,1 N), nitrógeno (dos determinaciones) 7,7 %, cenizas 2,7 %) se suspendió en el solvente y el residuo insoluble remanente luego de la disolución en baño de agua a ebullición (fracción HC₁) se descartó. El eluido se recogió en cuatro fracciones principales (Figura 41), de las cuales las fracciones HC₁, HC₃₋₁ y HC₃₋₂, que corresponden a los picos mayores, fueron las utilizadas en los análisis subsiguientes.

Las soluciones conteniendo cada una de las fracciones se concentraron (3 a 5 ml) y se purificaron por recromatografía sobre Sephadex G-100. La eliminación del cloruro de sodio se llevó a cabo por cromatografía sobre Sephadex G-15 (los estudios de diálisis efectuados con la fracción HC (ver Apéndice, pág. 212) indicaron el pasaje de la misma a través de la membrana y la imposibilidad de eliminar las sales por este método). Por concentración y liofilización se obtuvieron las fracciones puras:

Fracción HC₁

Se obtuvieron (Figuras 43 y 44) 38 mg de producto (rendimiento 3,8 %, nitrógeno, 3,3 %).

Fracción HC₃₋₁

Se obtuvieron 105 mg (rendimiento 10,5 %, nitrógeno 7,0 %) de producto, siendo necesario efectuar dos cromatografías sobre Sephadex G-15 para eliminar las sales (Figuras 47 y 48).

Fracción HC₃₋₂

Se obtuvieron 12 mg (rendimiento 1,2 %) de producto, siendo ne

cesario **proceder** como se indicó para la fracción HC₃₋₁ para obtener la fracción pura.

La separación de la fracción HC₃₋₂ en sus cuatro fracciones componentes se llevó a cabo sobre Sephadex G-15 (Figura 51). Las fracciones HC_{3-2a} (rendimiento 12,4 %, nitrógeno 6,5 %, cenizas 5,9 %) y HC_{3-2d} (rendimiento 0,7 %) resultaron prácticamente libres de cloruro de sodio. La fracción HC_{3-2b} se descartó y la HC_{3-2c} se recromatografió sucesivamente sobre Sephadex G-15 usando agua y etanol respectivamente como eluyentes (Figura 52), resultando aún impurificada con cloruro de sodio.

Se concentró y liofilizó la solución conteniendo el total de la fracción HC_{3-2c} (232 mg), se suspendió en dimetilsulfóxido (10 ml) y se dejó bajo agitación magnética durante 1 hora. La suspensión resultante se decantó durante 24 horas y se separó por centrifugación el residuo insoluble (cloruro de sodio). Experiencias previas llevadas a cabo con mezclas de la fracción HC y cloruro de sodio (1:10, en peso) indicaron una remoción del cloruro de sodio del 95 %. El insoluble se lavó con dimetilsulfóxido (1 ml) que se reunió con la solución, y se secó (67 mg). La solución sobrenadante se liofilizó y el material resultante se suspendió en etanol absoluto (2 ml), obteniéndose un residuo insoluble que se separó y se secó (70 mg, cenizas 94,3 %). Se liofilizó la solución sobrenadante y se repitió el último tratamiento, después de lo cual la solución resultante se liofilizó, con lo que se obtuvo la fracción HC_{3-2c} (rendimiento 5,0 %, cenizas 7,2 %).

HIDROLISIS DE LA FRACCION HC CON ENZIMAS PROTEOLITICAS

I) Hidrólisis con tripsina

La fracción HC (200 mg, nitrógeno (dos determinaciones) 11,1%, cenizas 10,4 %) se disolvió en 10 ml de solución buffer de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,8 y se incubó a 37° en un tubo de diálisis (1/4 pulgada) con 10 mg de tripsina, dializando en forma continua contra la misma solución buffer. Al cabo de cinco días de hidrólisis se agregó lentamente y con agitación constante, solución de ácido tricloroacético 40 % (3 ml) y se dejó en reposo durante 30 minutos. Se separó por centrifugación el precipitado y el sobrenadante se dializó contra agua destilada durante 45 horas. El material no dializado (fracción HC_T) se recuperó por concentración y liofilización, obteniéndose 14 mg (fracción HC_T: nitrógeno 2,2 %).

La determinación del porcentaje de fracción HC (no tratada con tripsina) precipitada por tratamiento con ácido tricloroacético 40 %, se realizó suspendiendo la fracción HC (50 mg) en agua destilada (2,5 ml) y agregando al sobrenadante de separar el residuo insoluble por

centrifugación (despreciable), ácido trioloroacético 40 % (0,8 ml) en las condiciones especificadas para la fracción HC tratada con tripsina. Se separó el precipitado y el sobrenadante se dializó en la forma indicada. Por concentración y liofilización se recuperaron 12 mg de la fracción HC (rendimiento 24 %, nitrógeno 7,08 %).

II) Hidrólisis con pronasa

La fracción HC (200 mg, idénticas propiedades generales) y la pronasa (40 mg) se suspendieron en 12 ml de solución buffer de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, con cloruro de calcio 0,005 M y se incubaron a 37° durante 24 horas con agitación constante. Finalizada la incubación, se centrifugó el residuo insoluble y la solución sobrenadante (12 ml) se dividió en dos partes (6 ml c/u) que se dializaron en tubos de diálisis (1/4 pulgada), una contra solución de cloruro de sodio 0,1 M (80 ml) durante 3 horas y la otra contra agua destilada (80 ml) durante 7 horas.

El contenido de ambos tubos de diálisis (fracción HC_p) se reunió, concentró y liofilizó, obteniéndose 80 mg (fracción HC_p: nitrógeno 9,0 %).

SUBFRACCIONAMIENTO DE LA FRACCION HC_p

Se efectuó por cromatografía sobre Sephadex G-100, empleando agua como eluyente. Por cromatografía sobre Sephadex G-25 no se obtuvo fraccionamiento.

La fracción HC_p (60 mg, nitrógeno 9,0 %) se suspendió en agua (1 ml) y se calentó en baño de agua a ebullición hasta disolución. El residuo insoluble (fracción HC_{pi}) se separó y se secó, y la solución sobrenadante se sembró sobre la columna de fraccionamiento. Se separaron las cuatro fracciones principales (Figura 35), se concentraron y liofilizaron.

Los resultados obtenidos están indicados en la Tabla 47.

S U S T A N C I A S P E C T I C A S

A I S L A M I E N T O

El residuo insoluble proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos de 15,88 g de semillas (fracción S_g), se extrajo con solución de oxalato de amonio 1 % (100 ml) a reflujo durante 2 horas. Se separó el extracto acuoso por centrifugación y se enfrió a temperatura ambiente. Se ajustó a pH 4 con solución de ácido acético 50 % sin que se observara precipitación, y se volcó sobre dos volúmenes de acetona. Se separó el precipitado obtenido, se lavó por intercambio de solvente con acetona y éter, y se secó. El procedimiento se repitió hasta aislar en forma exhaustiva las sustancias pécticas. El residuo insoluble remanente de la extracción se lavó con agua y se secó, obte-

niéndose 3,17 g (fracción S_p : rendimiento 20,0 %, nitrógeno 6,6 %, metoxilo 1,2 %).

P U R I F I C A C I O N

La purificación del producto crudo se llevó a cabo por suspensión del mismo en agua (29 ml/g de producto crudo), diálisis durante 28 horas y posterior concentración y liofilización, obteniéndose 3,19g (fracción P: rendimiento 20,1 %, nitrógeno 4,1 %, metoxilo 2,9 %).

SUBFRACCIONAMIENTO DE LA FRACCION P

Se realizó suspendiendo 0,70 g de la fracción P en agua (150 ml) y agitando durante 24 horas. El insoluble remanente en estas condiciones (fracción PA) se separó y se secó, previo lavado por intercambio de solvente con acetona y éter (fracción PA: rendimiento respecto de la semilla entera 3,0 %, nitrógeno 2,4 %, metoxilo 0,9 %).

Las aguas madres de la fracción PA se concentraron a una quinta parte de su volumen, se ajustaron a pH 4 con solución de ácido acético 50 % y se volcaron sobre dos volúmenes de acetona. El precipitado (fracción PB) se separó y se secó (fracción PB: rendimiento 15,3 %, nitrógeno 3,3 %, metoxilo 2,6 %).

Las aguas madres de la fracción PB se concentraron y liofilizaron, obteniéndose así la fracción PC (rendimiento 1,7 %, nitrógeno (dos determinaciones) 17,0 %, metoxilo 1,7 %).

Un resumen de los resultados obtenidos figura en la Tabla 29.

E X T R A C C I O N E S C R U Z A D A S

SECUENCIA N° 1

Se trataron 6,0 g del residuo proveniente de la extracción consecutiva de los galactomananos y las hemicelulosas (fracción S_h) con solución de oxalato de amonio 1 % (100 ml) de la manera descripta para el aislamiento de las sustancias pécticas. Al cabo de una serie de cinco extracciones sucesivas y posterior purificación por diálisis, se obtuvieron 0,455 g de la fracción P (rendimiento respecto de la semilla entera: 1,2 %, nitrógeno 3,1 %, metoxilo (dos determinaciones) 0,9 %).

El residuo insoluble remanente de la extracción se suspendió en agua, se dializó durante 28 horas, se concentró y liofilizó, obteniéndose 4,78 g (fracción S_{hp} : rendimiento respecto de la semilla entera 12,9 %).

SECUENCIA N° 2

Se trataron 2,2 g del residuo proveniente de la extracción consecutiva de los galactomananos y las sustancias pécticas (fracción S_p) con solución de hidróxido de potasio 10 % (80 ml) de la manera descripta para el aislamiento de las hemicelulosas (Procedimiento 2). Se efectuó una única extracción y se obtuvieron 0,554 g de la fracción H (ren

dimiento respecto de la semilla entera 4,94 %; fracción HA 0,07 %, nitrógeno 4,1 %; fracción HB 2,16 %, nitrógeno 6,0 %; y fracción HC 2,71 %, nitrógeno 10,6 %).

El residuo insoluble remanente de la extracción se suspendió en agua, se dializó hasta neutralidad, se concentró y liofilizó, obteniéndose 1,53 g (fracción S_{ph}: rendimiento respecto de la semilla entera 13,7 %).

Los resultados obtenidos mediante ambas secuencias aparecen en la Tabla 30.

P O L I S A C A R I D O S S O L U B L E S E N
S O L U C I O N D E U R E A 7 M

El residuo proveniente de la extracción exhaustiva de los galactomananos de 50,4 g de semillas (fracción S_g), se extrajo con solución de urea 7 M (600 ml) durante 17 horas. Se separó por centrifugación el extracto acuoso y el procedimiento se repitió dos veces más. Se reunieron los tres extractos acuosos, se dializaron durante 24 horas y se concentraron. Los polisacáridos se precipitaron por adición de cuatro volúmenes de etanol y se separaron por centrifugación, obteniéndose 0,504 g (fracción U: rendimiento 1,0 %, nitrógeno 3,8 %, metoxilo 2,1 %). Por concentración y liofilización de las aguas madres de la fracción U se obtuvieron 0,076 g (0,15 %) que se descartaron.

O X I D A C I O N C O N P E R I O D A T O
O X I D A C I O N C O N P E R I O D A T O D E L A F R A C C I O N H A

Se efectuó en la forma descripta en la técnica general. La fracción HA (31,0 mg) se suspendió en la solución de periodato de sodio 0,015 M (7 ml) en un matraz aforado de 10 ml y se mantuvo en agitación en un Vibro Mixer. Antes de tomar la primera alícuota se llevó a volumen. La oxidación se realizó durante 23 días (Figura 26).

Para la reducción del polialdehído se separó por centrifugación el residuo insoluble y se destruyó el exceso de periodato de sodio del sobrenadante por agregado de formiato de plomo (67 mg). Al cabo de 3 días se centrifugó el precipitado y el sobrenadante se trató con borohidruro de sodio durante 1 día. El residuo insoluble de la oxidación se suspendió en agua (1 ml) y se redujo con borohidruro de sodio. Se reunieron ambas fracciones y se dializaron durante 48 horas. Por concentración y liofilización se obtuvieron 27 mg del polialcohol.

O X I D A C I O N C O N P E R I O D A T O D E L A F R A C C I O N H A D E G R A D A D A I N S O L U B L E P O R H I D R O L I S I S A C I D A P A R C I A L (ácido sulfúrico 0,05 N) (fracción a)

Se llevó a cabo en la forma descripta en la técnica general

suspendiendo 31,6 mg de muestra en la solución de periodato de sodio 0,015 M (7 ml). No se logró disolución total, efectuándose por lo tanto la oxidación en un Vibro Mixer y llevando a volumen (10 ml) antes de extraer la primera alícuota (Figura 27).

La reducción del polialdehído resultante de la oxidación (9 días) se efectuó luego de dializar la suspensión durante 24 horas. Se agregó el borohidruro de sodio y se dejó a temperatura ambiente durante 3 días. La suspensión se desionizó por diálisis durante 48 horas, se concentró y liofilizó (29,4 mg).

La hidrólisis ácida suave del polialcohol se llevó a cabo por el método de Smith (1959) siguiendo la técnica descripta por Misaki y Kanamaru (1968). El polialcohol (6,0 mg) se trató con 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N a temperatura ambiente durante 18 horas en un Vibro Mixer. El material insoluble se separó por centrifugación y se sometió al mismo tratamiento, al cabo de las cuales el residuo insoluble remanente se separó por centrifugación y se descartó. Los hidrolizados se reunieron, se neutralizaron con carbonato de bario, se centrifugaron y se llevaron a sequedad.

La oxidación con periodato se repitió con la fracción HA degradada insoluble proveniente de la hidrólisis parcial preparativa. Se suspendió la muestra (180,8 mg) en la solución de periodato de sodio 0,015 M (50 ml) y se determinó el consumo de periodato y la formación de ácido fórmico (Figura 29) durante la oxidación (29 horas).

La suspensión del polialdehído resultante se dializó durante 24 horas, se agregaron 0,25 ml de etilenglicol y al cabo de 24 horas 200 mg de borohidruro de sodio y se dejó durante 48 horas más. La suspensión se desionizó por diálisis durante 54 horas, se separó la fracción insoluble, que se lavó y se secó (96 mg, nitrógeno 5,5 %), y el sobrenadante se concentró y liofilizó (92 mg, nitrógeno 5,3 %).

Se efectuó la oxidación exhaustiva con periodato de sodio de ambas fracciones, para lo cual se suspendieron (fracción insoluble, 6,80 mg; fracción soluble, 6,46 mg) en matraces aforados de 2,1 ml conteniendo la solución de periodato de sodio 0,015 M y se agitaron en un Vibro Mixer (Figura 30).

DETERMINACION DE LAS UNIONES O - GLICOSIDICAS A SERINA Y/O TREONINA EN LA FRACCION HC

Tratamiento alcalino de la fracción HC

El tratamiento alcalino de la fracción HC se llevó a cabo disolviendo la misma (24,0 mg) en solución de hidróxido de sodio 0,1 N

(30 ml) y manteniéndola a 5° durante 332 horas.

Se registró el espectro de absorción ultravioleta de la solución (Figura 54, A) a intervalos regulares de tiempo, utilizando como referencia una solución de la fracción HC (25 mg) en agua (25 ml) y como blanco la solución de hidróxido de sodio.

Paralelamente se trató en forma análoga durante 141 horas una mezcla de los aminoácidos fenólicos (tirosina, triptofano y fenilalanina en una relación molar de 1:1:1) en solución de hidróxido de sodio 0,1 N (0,1 μ moles/ml de cada aminoácido).

Reducción de la fracción HC

Se efectuó el tratamiento alcalino de la fracción HC en la forma antes indicada, y al cabo de 70 1/2 horas se llevó a cabo la reducción siguiendo la técnica descripta por Tanaka y col. (1964). Se agregaron a la solución alcalina de la fracción HC 0,340 g de borohidruro de sodio y se mantuvo a 5° durante 266 horas más. A la mezcla de los aminoácidos fenólicos (6 ml), pero no sometida al tratamiento alcalino, se agregaron 68 mg de borohidruro de sodio y se mantuvo a 5° durante 140 horas.

Los espectros de absorción ultravioleta se registraron a diferentes tiempos (Figura 54, B).

Al cabo de 266 horas de tratamiento con borohidruro, la reducción de la fracción HC se completó (Tanaka y Pigman, 1965) por agregado de cloruro de paladio dihidrato (purificado, 34 mg) y borohidruro de sodio (91 mg) con agitación vigorosa. Se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente y se eliminó el exceso de reductor por agregado de solución de ácido acético 1 N hasta pH 5-6. Se llevó luego a alcalinidad y se registró el espectro de absorción ultravioleta (Figura 54, C).

E S T U D I O S D E D I A L I S I S

I) CONTROL DE LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

Los estudios se efectuaron siguiendo la técnica indicada para las diálisis analíticas y utilizando la fracción HC como muestra patrón.

Los porcentajes de material no dializado se obtuvieron para las membranas modificadas y sin modificar, a intervalos regulares de tiempo (Tabla 64).

Tabla 64. Velocidad de difusión de la fracción HC a través de membranas modificadas y sin modificar.^a

T (hs)	Membrana sin tratar (%)	Membrana calentada a 90° (%)	Membrana acetilada	
			%	Nitrógeno (%)
24	43,1	43,6		
25			53,8	9,1 ^b
45			37,4	
53	30,2	33,0		
75			29,8	9,9 ^b
78			28,4	
79	21,7	22,0		
98			23,1	
140				
144	14,3	16,9		
168			17,0	10,5
188				
192	9,2			

^a Se expresaron los porcentajes de material no dializado.
^b Corresponde al porcentaje de nitrógeno de la fracción que dializó en ese intervalo de tiempo.

De los gráficos de logaritmo de porcentaje de soluto sin diali-
zar en función del tiempo de diálisis (Figura 70), trazados para cada
tipo de membranas, se comprobó que la reducción del tamaño del poro
por calentamiento o por acetilación resultó efectiva. Por otra parte
se pudo observar la heterogeneidad de la fracción HC deducida de la
discontinuidad de la curva, dado que para distintos componentes las ve-
locidades individuales de difusión son suficientemente diferentes. Los
estudios de Craig y col. (1957) realizados sobre polipéptidos y proteí-
nas, indicaron que a menos que existan asociaciones moleculares o con
la membrana, un soluto puro debe dar en este tipo de gráficos una lí-
nea recta (Figura 71). En el caso de la fracción HC la falta de linea-
lidad observada indicó la posibilidad de estar en presencia de tres o
más componentes de distinto peso molecular, resultados que fueron coin-
cidentes con los obtenidos por cromatografía sobre geles y electrofore

sis.

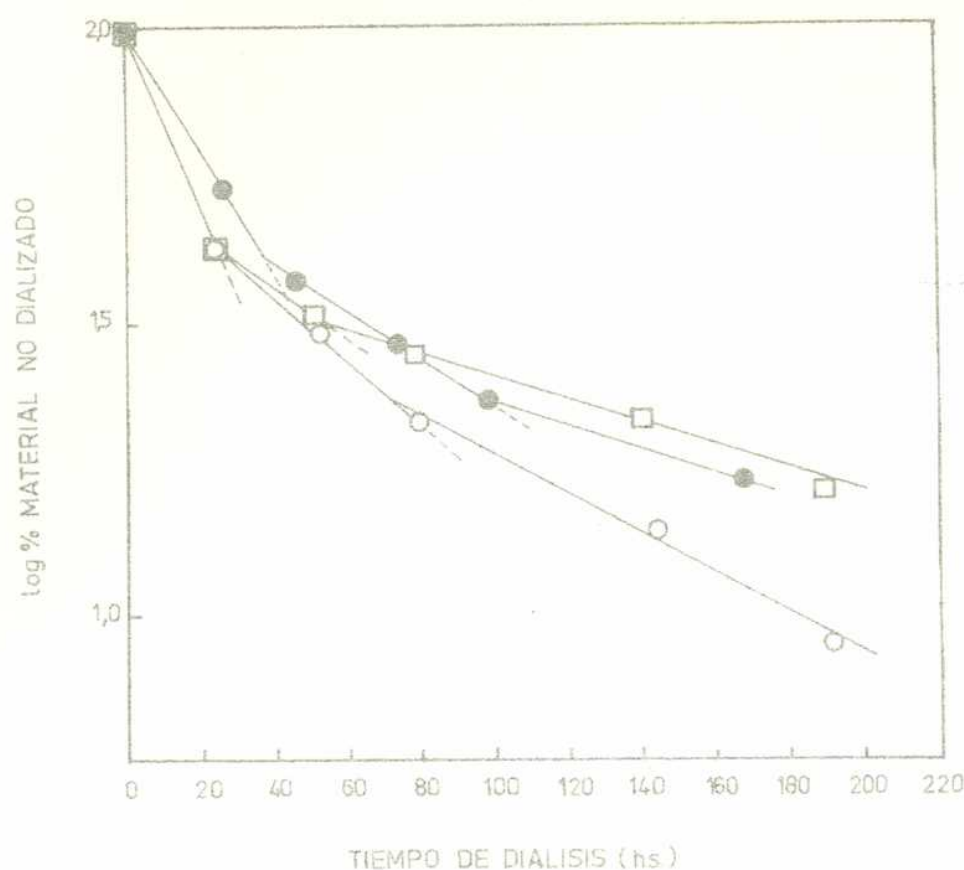


Figura 70. Curvas de diálisis para la fracción HC a través de membranas: sin modificar (○); calentada a 90° durante 24 hs. (□); acetilada (●).

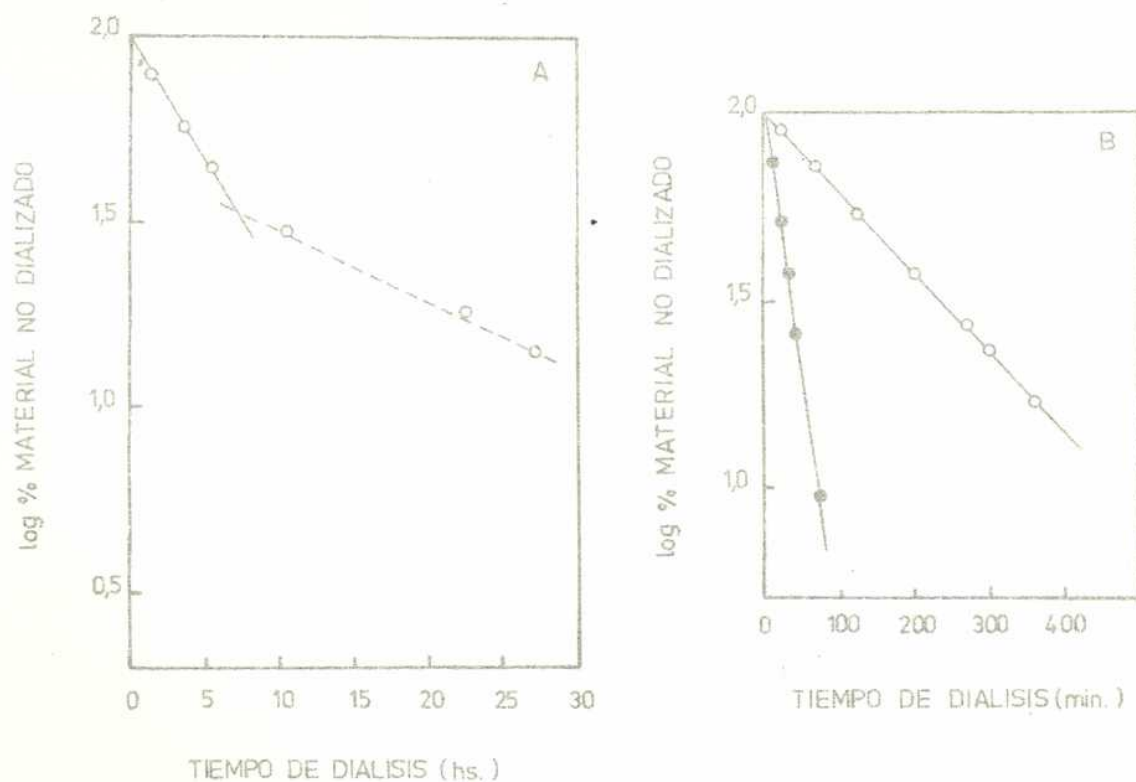


Figura 71. Curvas de diálisis: A, mezcla artificial de ribonucleasa y quimotripsinógeno en partes iguales, a través de una membrana de 20/32 y contra ácido acético 0,01 N; B, bacitracina (●) y subtilina (○) a través de una membrana 18/32, en el mismo medio (Craig y col., 1957).

II) CONTROL DE LA ELIMINACION DE SALES POR DIALISIS

Los estudios de diálisis se efectuaron siguiendo la técnica general y utilizando como muestra patrón una mezcla de la fracción HC y

cloruro de sodio (1:10, en peso), relación equivalente a la que presentaban las muestras a purificar. Se emplearon membranas modificadas por acetilación.

A partir de la curva de porcentaje de soluto dializado en función del tiempo (Figura 72) se obtuvieron los tiempos óptimos de separación por diálisis: 35 minutos para una remoción del cloruro de sodio

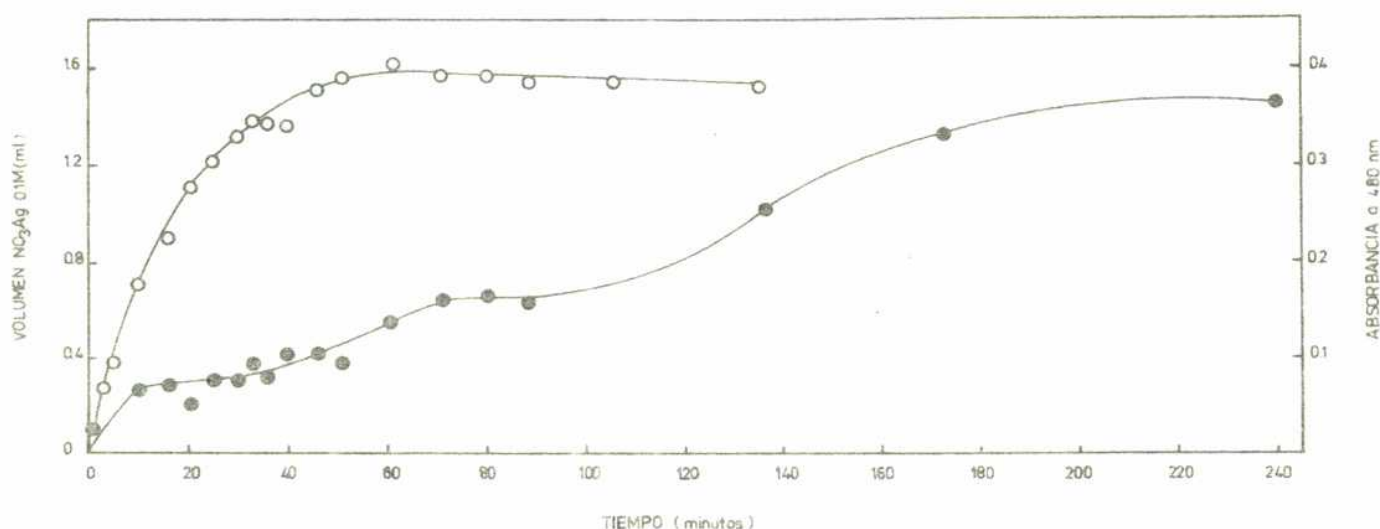


Figura 72. Curva de diálisis para una mezcla de fracción HC y ClNa (1:10, en peso) en una membrana acetilada. Volumen de NaCl 0.1 M (○); hidratos de carbono, absorbancia a 480 nm (●) (reactivo de fenol-ácido sulfúrico).

del 75 %, y de 55 minutos para una remoción del 85 %. Experiencias de tipo preparativo llevadas a cabo en condiciones análogas y dializando durante los tiempos antes indicados, confirmaron los resultados analíticos.

En general ha sido encontrado (Craig y King, 1955) que este tipo de curvas son reproducibles y para compuestos puros presentan siempre la misma forma (Figura 73).

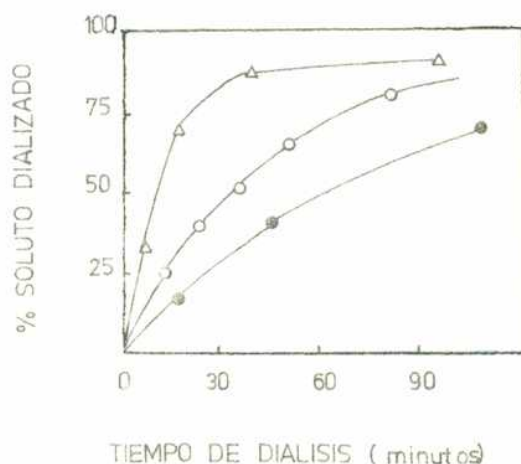


Figura 73. Curva de diálisis para distintos solutos a través de membranas 20/32. ClNa (△); fenilalanina (○); sacarosa (●) (Craig y King, 1955).

III) VELOCIDAD DE DIALISIS: INCREMENTO EN PRESENCIA DE CLORURO DE SODIO

Los estudios se realizaron sobre los productos obtenidos por desproteinización de la fracción HC con pronasa, utilizando una membrana sin modificar y dializando contra agua o contra solución de cloruro de sodio 0,1 M. Los resultados (Figura 74, Tabla 65) indicaron en este último caso un incremento del 25 %.

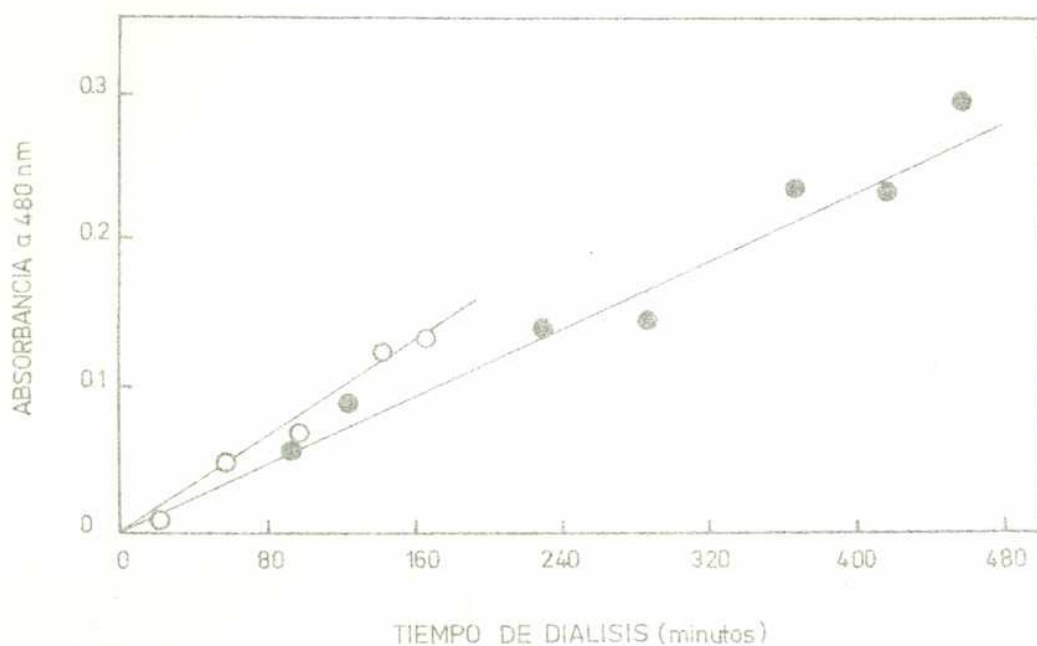


Figura 74. Diálisis de la fracción HC_p contra ClNa 0,1 M (○) y contra agua (●).

Tabla 65. Estudios de diálisis sobre la fracción HC_p.

Tiempo (min)	Medio ^a	
	ClNa 0,1 M	Agua
20	0,005	
56	0,001	
90		0,047
95	0,057	
120		0,075
141	0,105	
166	0,112	
183	0,100	
227		0,119
285		0,126
365		0,200
417		0,197
455		0,250

^a Se expresaron los valores de la absorbancia a 480 nm (hidratos de carbono por el método de Dubois).

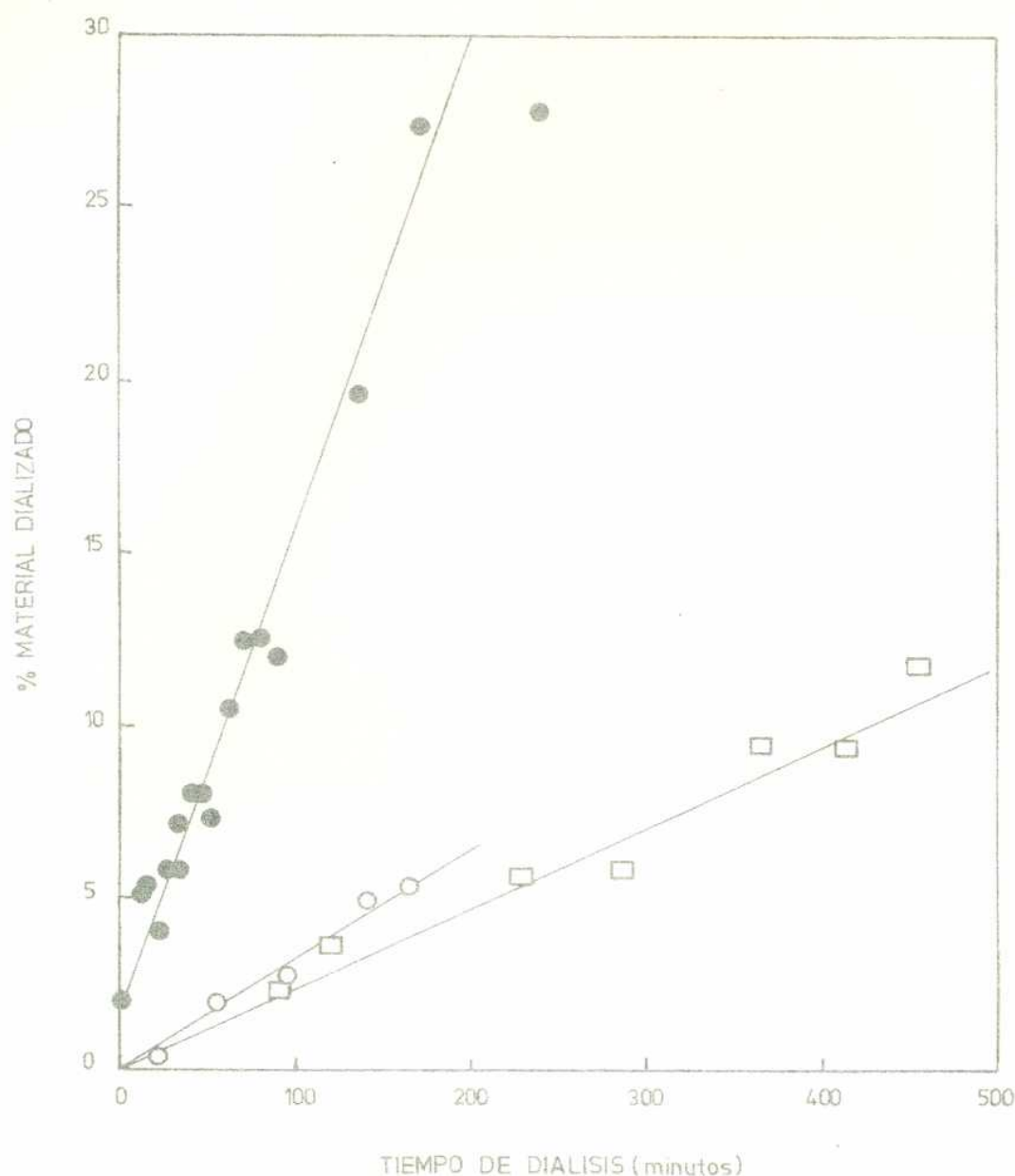


Figura 75. Curvas de diálisis para la fracción HC en distintos medios. (●) fracción HC más CNa (1:10, en peso) en membrana acetilada; (○) fracción HC_p contra CNa 0,1 M y (□) contra agua, en membrana sin modificar. La concentración final en CNa resultó de 0,20 M para (●) y de 0,09 M para (○). Los valores representados en (●) se calcularon a partir de los representados en la Figura 72, por conversión de los valores de absorbancia a 480 mμ a los correspondientes valores en peso (las diferencias en la representación surgen de las distintas escalas utilizadas).

CONCLUSION

Los estudios de diálisis efectuados permiten afirmar que los productos obtenidos por extracción alcalina de las semillas de Gleditsia triacanthos difunden parcialmente a través de la membrana sin modificar, y en el caso particular de la fracción HC se tratarían de compuestos de bajo peso molecular.

Por otra parte existen referencias (McBain y Stuewer, 1936) de que el tratamiento de los tubos de diálisis con soluciones de hidróxido de sodio produce un aumento de la porosidad de las membranas. Cuando se llevó a cabo la extracción de las hemicelulosas controlando la etapa de neutralización por diálisis, se verificó (reactivo de fenol-ácido sulfúrico) la pérdida de material extraído por pasaje a través

de la membrana.

Esto explicaría asimismo la falta de reproducibilidad observada en el método de aislamiento empleado, mientras que la difusión de los compuestos de menor peso molecular justificarían los bajos rendimientos obtenidos en los métodos de purificación de las fracciones HA, HB y HC que involucran la técnica de diálisis en alguna de sus etapas.

Por último, la hipótesis de que la fracción HC tiene bajo peso molecular parecería estar en contraposición con el hecho de que la misma ha sido aislada de una solución que fue dializada por más de tres días. En efecto, cuando la fracción HC se dializó en sistema cerrado contra agua se observó que al cabo de 24 horas el 57 % del material inicial (Tabla 64) pasó a través de la membrana y al cabo de ocho días dializó otro 29 %, quedando retenido solamente un 9 % como material no dializable. Resultados equivalentes se obtuvieron con membranas modificadas (Tabla 64), aunque con un mayor porcentaje de material no dializable (Figura 70). Estos resultados pueden ser explicados suponiendo una fuerte tendencia de esos compuestos de menor peso molecular a asociarse con los de mayor peso molecular, separados luego como hemicelulosas A y B, para formar agregados de tamaño suficiente como para ser retenidos en el tubo de diálisis. Este tipo de asociación molecular ha sido encontrada en otras hemicelulosas (Blake y Richards, 1971 a,b). Estas consideraciones han sido expuestas con mayor detalle al discutir los resultados obtenidos con la hemicelulosa C.

DISCUSION SOBRE LOS METODOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACION Y VALORACION DE LOS AZUCARES POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

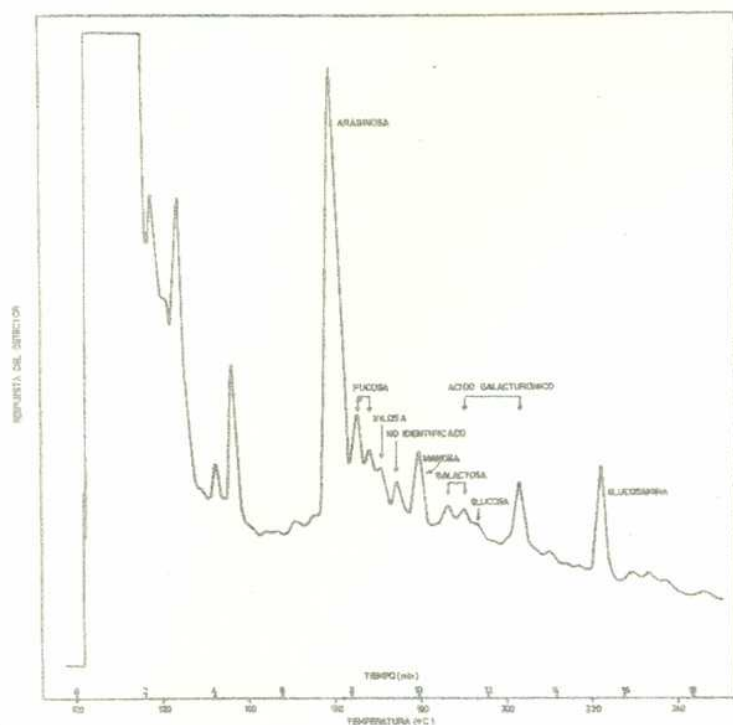
La identificación cualitativa de los monosacáridos componentes de las fracciones aisladas, por hidrólisis ácida total y cromatografía sobre papel, indicó la presencia de una mezcla compleja de polisacáridos. Los intentos de valorar colorimétricamente las hexosas, pentosas y ácidos hexourónicos de dichas fracciones y de las subfracciones obtenidas a partir de las mismas por los métodos de purificación y/o fraccionamiento y degradación, confirmaron los resultados anteriores. Las dificultades inherentes a este tipo de análisis para la determinación de las relaciones molares y la necesidad de disponer de una técnica que utilizara poca cantidad de material y permitiera la identificación y valoración simultánea de los monosacáridos, determinaron el uso de la cromatografía gas-líquido en los estudios subsiguientes. Para ello se llevó a cabo la puesta a punto de los métodos a utilizar (ver Parte

Experimental), cuyos aspectos más importantes están discutidos a continuación.

OBTENCION DE LOS MONOSACARIDOS COMPONENTES

El primer paso en el análisis de los hidratos de carbono unidos covalentemente, consiste en la ruptura de la unión glicosídica para obtener los monosacáridos componentes. Esto se lleva a cabo generalmente por hidrólisis con solución acuosa de ácido o por medio de resinas intercambiadoras de cationes (forma protonada). Un método alternativo es la ruptura por medio de la metanólisis, con obtención de los metilglicósidos. Esta técnica es el procedimiento de ruptura más simple para el análisis de los hidratos de carbono por cromatografía gaseosa: la marcada estabilidad de los metilglicósidos durante la metanólisis, la re-N-acetilación y la trimetilsililación (Clamp y col., 1967) contrarresta el problema de la formación de anómeros. La técnica presenta además otra serie de ventajas:

- a) Los metilglicósidos de manosa y galactosa son separados adecuadamente (Figuras 15, 16 y 17) a diferencia de los azúcares libres, para los que se observa superposición de ciertos picos (Oates y Schrager, 1967).
- b) La metanólisis protege los grupos reductores como metilglicósidos y reduce, por lo tanto, la posibilidad de reacciones laterales.
- c) Los grupos carboxilos de los ácidos urónicos y siálicos son convertidos en sus **ésteres metílicos**, los cuales son no sólo más estables sino que son derivados apropiados para la cromatografía gaseosa.
- d) Luego de la metanólisis, cada monosacárido da lugar a varios picos (Tabla 55). Algunos sistemas analíticos, basados en la hidrólisis ácida, incluyen la reducción de los azúcares libres al correspondiente glicitol (Sawardeker y col., 1965; Oades, 1967; Kim y col., 1967; Lehnhardt y Winzler, 1968) con lo que se obtiene un único pico en la cromatografía gaseosa. Desafortunadamente, en los materiales vegetales y en especial en los polisacáridos complejos, hay por lo general cierto grado de contaminación "background" (Figuras 76, 77 y 78) y la identificación de un monosacárido por la aparición de un único pico es a menudo difícil. De ahí que la presencia de un multiplete característico cuyos picos presenten tiempos de retención relativos y proporción de las áreas conocidos (Tabla 55), permite identificar cualquier monosacárido.
- e) Otra ventaja de los multipletes resulta evidente cuando hay superposición de picos de distintos monosacáridos: como la proporción de las áreas es constante, dentro de los límites del error experimental (Tabla 55), la cantidad del monosacárido puede ser calculada a partir de los picos no superpuestos (Figura 77, ver Tabla 55).
- f) Los aminoácidos como serina, treonina, prolina, ácidos glutámico y



Fracción 76. Cromatografía gas-líquido sobre OV-17 3% de los metilglucósidos obtenidos de la fracción H_2 .

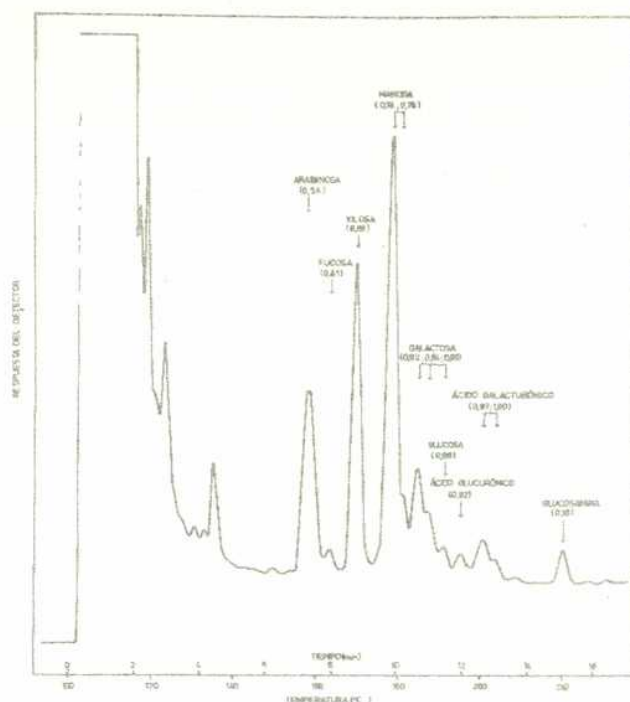


Figura 77. Cromatografía gas-líquido sobre OV-17 3% de los metilglucósidos obtenidos de la fracción U. Los números entre paréntesis indican los tiempos de retención relativos (respecto a meso-inositol) de los picos resueltos para cada monosacárido.

aspártico, no interfieren en el análisis de los hidratos de carbono por este procedimiento (Clamp y col., 1967).

g) Los O-trimetilsilil derivados de los metilglucósidos resultaron ser los derivados más adecuados para la identificación y valoración simultánea de todos los monosacáridos componentes de las muestras, en un único procedimiento y sobre las fases líquidas disponibles en nuestro Laboratorio.

ESTABILIDAD DE LOS MONOSACARIDOS

La estabilidad bajo distintas condiciones de metanólisis de los monosacáridos comunmente encontrados en los materiales biológicos, ha sido extensivamente estudiada por Chambers y Clamp (1971): todos los monosacáridos son estables hasta una concentración de cloruro de hidrógeno en metanol 2 M a 85° y 1 M a 100°, excepto los ácidos hexourónicos (pérdidas del 3 % y 9 %, respectivamente). A concentraciones superiores los monosacáridos sufren destrucción en distinta medida. Estos autores compararon las respuestas relativas molares de los monosacáridos tratados con cloruro de hidrógeno 1 M en metanol a 85° durante 24 horas con las respuestas relativas molares obtenidas por trimetilsililación directa de metilglucósidos auténticos, y no encontraron diferencias significativas, lo que indicó que no se producen pérdidas.

La Tabla 56 muestra las respuestas relativas molares, obtenidas en nuestro caso, para los monosacáridos tratados con cloruro de hi

drógeno 0,5 M en metanol a 65° durante 16 horas (método 1, ver Parte experimental) y derivatizados, y la Figura 55 da también los valores encontrados para las respuestas relativas molares (pendiente de la recta) obtenidas por trimetilsililación de los metilglicósidos sintetizados por el método 2. En ambos casos, las respuestas relativas molares calculadas son del orden de las informadas por distintos autores (Clamp y col., 1967; Bhatti y col., 1970 y referencias allí citadas). Las diferencias observadas entre los dos métodos han sido atribuidas fundamentalmente, dadas las condiciones suaves usadas, a la pérdida de azúcares durante la etapa de remoción del ácido clorhídrico, aunque no se excluye, para ambos valores, la posibilidad de destrucción durante la inyección en el cromatógrafo ya que se empleó cámara de inyección y columnas metálicas. Chambers y Clamp (1971) encontraron que la remoción del ácido clorhídrico en metanol por evaporación al vacío produce la pérdida de los metilglicósidos (porcentaje variable según el monosacárido) y la aparición de picos extraños en el cromatograma provenientes (Wulff, 1965) de la degradación parcial de los metilglicósidos.

Con todo, teniendo en cuenta la menor concentración de ácido clorhídrico utilizada (0,5 M) y el uso de las respuestas relativas molares obtenidas siguiendo la misma técnica que para las muestras analizadas (método 1, Tabla 56), la remoción del ácido clorhídrico se llevó a cabo por evaporación directa bajo corriente de nitrógeno. A diferencia de la técnica de neutralización con carbonato de plata que puede producir pérdida de los azúcares, especialmente del patrón interno, por adsorción sobre las sales insolubles de plata, esta técnica permite realizar el procedimiento total (desde la metanólisis hasta la trimetilsililación) en el mismo tubo.

El procedimiento general de metanólisis (Procedimiento 1) fue modificado de manera de producir la ruptura de las uniones glicosídicas en condiciones más suaves (Procedimiento 3: 1,5 hora a 65°) y determinar el ácido N-acetilneuramínico, o en condiciones más enérgicas (Procedimiento 2: ácido trifluoracético 2 N a 121° durante 2 horas) para la recuperación total de los aminoazúcares (ver a continuación). Con respecto a esta última técnica, Albersheim y col. (1967) estudiaron la hidrólisis de los polisacáridos de las paredes celulares y encontraron serias dificultades para lograr un compromiso adecuado entre la degradación de los componentes liberados y la hidrólisis incompleta, resultando un tiempo óptimo de 1 hora para la mayoría de los azúcares. En nuestro caso, los análisis se llevaron a cabo mediante ambos procedimientos (1 y 2) siguiendo para este último la técnica de Reinhold

(1972) que recomienda 2 horas de tratamiento con ácido trifluoroacético. Los azúcares son estables en esas condiciones (Albersheim y col., 1967). Las diferencias entre los datos obtenidos por ambos procedimientos (Figura 78, Tabla 66) resultaron, excepto para la glucosamina como era de esperar, dentro del margen de error del método ($\pm 8-10\%$).

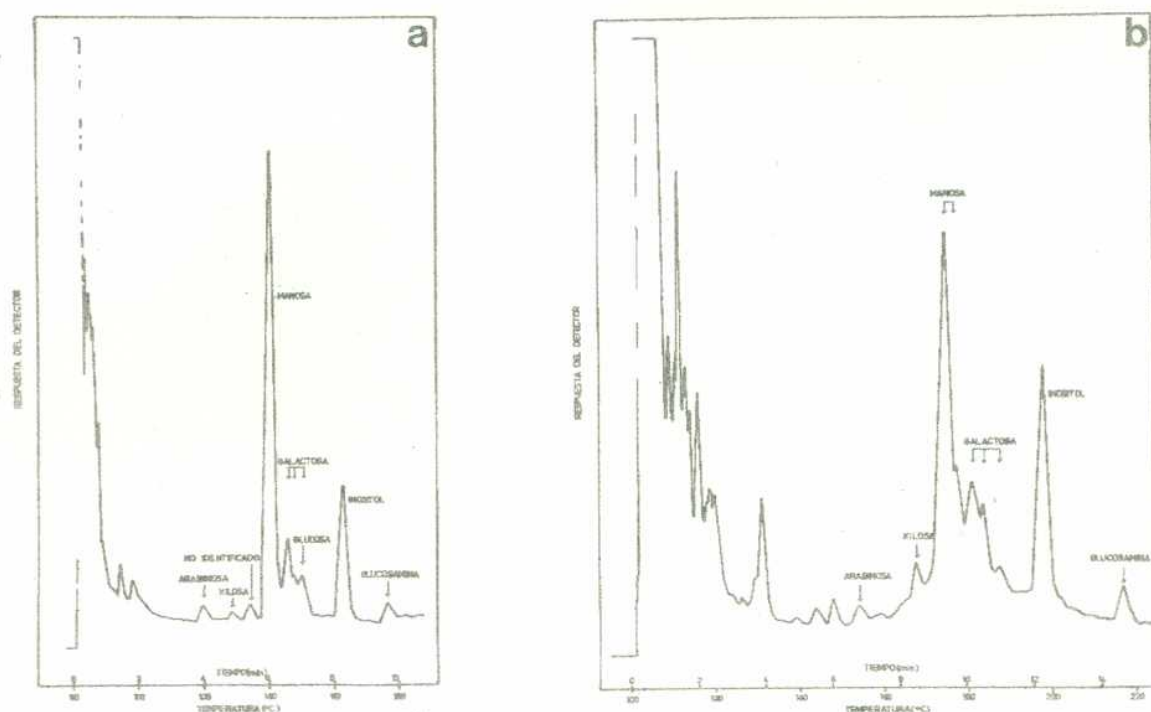


Figura 78. Cromatografía gas líquido de los metilglicósidos obtenidos de la fracción HC₃₋₁ siguiendo: a, procedimiento 1 y sobre OV-17 0,5 %; b, procedimiento 2 y sobre OV-17 3%.

Tabla 66. Composición en monosacáridos de la fracción HC₃₋₁ (moles %).

Monosacárido	Procedimiento 1	Procedimiento 2
Arabinosa	4,9	4,3
Fucosa	0	Tr
Xilosa	2,5	2,9
Manosa	65,1	62,8
Galactosa	22,9	23,5
Glucosa	1,8	0
Ácido galacturónico	ND	2,8
Glucosamina	2,8	4,3

En general el empleo de hidrólisis ácida produce una mayor destrucción de los hidratos de carbono que la metanólisis (Wulff, 1965), y los materiales de origen biológico dan lugar a cromatogramas más complejos, difíciles de interpretar, cuanto más extremas son las condiciones. En efecto, Chambers y Clamp (1971) indicaron que un cierto número de picos no identificados, provenientes posiblemente de los productos

de degradación de aminoácidos e hidratos de carbono (Wolfson y Kashimura, 1969), pueden aparecer en distintas zonas del cromatograma.

El uso de factores de corrección relacionados con la velocidad de destrucción de cada azúcar según el procedimiento empleado, sólo puede ser considerado en una primera aproximación dado que la ruptura varía con cada polisacárido (Reinhold, 1972).

Por último cabe mencionar que el procedimiento 2 no hidroliza (Talmadge y col., 1973) los enlaces glicosídicos de la celulosa, hecho observado en nuestras experiencias (ver por ejemplo, la composición en monosacáridos de las fracciones remanentes de extraer las hemicelulosas (fracción S_h) y las hemicelulosas y las sustancias pécticas (fracción S_{hp} , Tabla 27), en las que no se observa un incremento considerable de la cantidad de glucosa y para las que se obtuvo, al final de la metanólisis por el procedimiento 2, un residuo insoluble apreciable). El método no hidroliza cuantitativamente, además, las uniones β -(1 \rightarrow 4)-glucosídicas de los xiloglucanos, y produce la degradación y pérdida de la mayoría de los restos uranosílicos (Jones y Albersheim, 1972). En cambio, el procedimiento libera intacto todos los otros azúcares neutros.

DETERMINACION DE LAS HEXOSAMINAS

De todas las uniones encontradas en las glicoproteínas, las más resistentes a la metanólisis parecen ser las β -(1 \rightarrow 4)- entre las unidades de N-acetilglucosamina. Si se produce la desacetilación de alguna de las acetamidohexosas involucradas en el enlace, la especie cargada resultará mucho más resistente a la ruptura por el ácido. A diferencia de los valores informados por Chambers y Clamp (1967), que obtuvieron la liberación cuantitativa de las acetamidohexosas unidas por este tipo de enlace con cloruro de hidrógeno 1 M en metanol a 85°, Levvy y col. (1970) encontraron que la metanólisis es adecuada para los azúcares neutros pero las acetamidohexosas son mejor hidrolizadas con solución acuosa de ácido. Reinhold (1972) recomienda para los aminoazúcares el tratamiento previo de la muestra con ácido trifluoracético 2 N a 121° durante dos horas (Procedimiento 2), seguido del procedimiento general de metanólisis. La Tabla 66 (Figura 78) muestra los resultados obtenidos para la glucosamina con y sin el tratamiento previo (Procedimientos 2 y 1, respectivamente) de la fracción HC_3-1 , observándose el incremento en la liberación de la misma con el tratamiento previo. Este hecho es particularmente importante dada la probable existencia de las unidades de glucosamina sin acetilar en la molécula del polisacárido (ver Efectos de la extracción en medio alcalino, pág. 48).

La metanólisis de una acetamidohexosa produce una mezcla de

las formas amino libre (Ludowieg y Dorfman, 1960) y acetamido difícil de valorar y que aumentan la complejidad de los cromatogramas. En efecto, las acetamidohexosas tratadas con clorhídrico metanólico pero no re-N-acetiladas dieron lugar a picos extras en la zona de la manosa y de la galactosa (Chambers y Clamp, 1971), que fueron identificados como los correspondientes metilhexosaminidos por comparación con los compuestos auténticos. De ahí que el paso de la re-N-acetilación (ver Tratamiento de los productos de metanólisis, pág. 155) sea esencial para el análisis de los aminoazúcares y serviría, asimismo, para la N-acetilación de los grupos aminos libres presentes originariamente en la molécula.

DETERMINACION DE LOS ACIDOS HEXOURONICOS

La cromatografía gaseosa es aplicable a la determinación de los ácidos urónicos sólo mediante métodos específicos (Jones y Alberheim, 1972) y en las condiciones experimentales usadas, los datos informados para los ácidos galacturónico y glucourónico pueden no ser cuantitativos (ver los efectos antes mencionados). La determinación por cromatografía en papel tiene también escaso valor debido a las pérdidas producidas durante la hidrólisis y los pasos de neutralización. Como en los métodos colorimétricos (ver Parte Experimental) la respuesta puede estar influida por la naturaleza del ácido urónico o su entorno molecular, la determinación cuantitativa en aquellos casos en que no ha sido identificado o el polisacárido presenta más de un tipo de ácido urónico, se lleva a cabo por titulación o por descarboxilación (ver Parte Experimental).

EFFECTO DE LOS CONTAMINANTES

Los contaminantes de naturaleza orgánica, comunmente encontrados en los materiales de origen vegetal, no interfieren en la metanólisis o en la trimetilsililación, aunque pueden producir picos extraños en los cromatogramas.

En presencia de cantidades considerables de sales, las respuestas relativas molares, especialmente las de las acetamidohexosas, son menores que las esperadas.

El exceso de reactivos, los picos extraños y los posibles productos de degradación antes mencionados, determinan que el solvente aparezca como un pico complejo aún en los casos de muestras relativamente sencillas (Figura 79, Tabla 48).

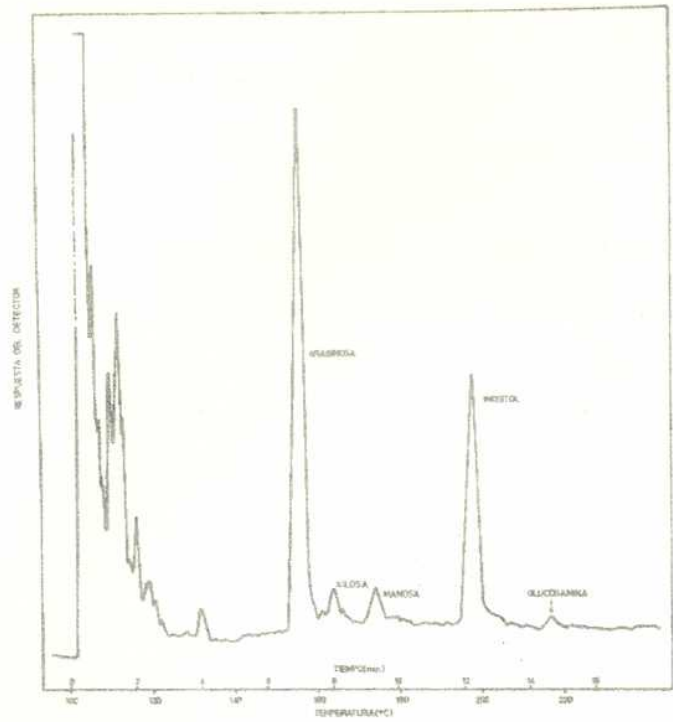


Figura 79. Cromatografía gas-líquido sobre OV-17 3 % de los metilglucósidos obtenidos de la fracción HC 3-2 c°

Este trabajo de Tesis tuvo por objeto el estudio del sistema de polisacáridos aislado de las semillas de Gleditsia triacanthos. En él se presentan:

- 1) Una introducción donde se señalan las principales propiedades que confieren a la familia de las Leguminosas considerable importancia dentro de los vegetales superiores, y las características botánicas del género Gleditsia y de la especie Gleditsia triacanthos.
- 2) Para una mejor comprensión del tema de investigación encarado, caracterizado no sólo por la diversidad y la amplitud del enfoque, sino también por la abundante literatura relacionada con el mismo y que recién se ha hecho específica en los últimos años, se procedió a revisar los capítulos teóricos correspondientes. A los efectos de llevar a cabo esta revisión dentro del margen mínimo compatible con dicha comprensión, sólo se incluyeron aquellos aspectos considerados indispensables. Este resumen teórico abarca:
 - a) La descripción de los polisacáridos de semillas de leguminosas, en especial en relación con su función (estructurales o de reserva), los estudios llevados a cabo en nuestro país sobre el género Gleditsia y los trabajos químicos realizados hasta el momento sobre las semillas de Gleditsia triacanthos y los polisacáridos aislados de las mismas (galactomananos).
 - b) La enumeración de las características de las proteínas de semillas de leguminosas, fundamentalmente las de reserva, y de las proteínas estructurales de ésta y otras fuentes, a los efectos de marcar las diferencias entre ambos tipos de proteínas.
 - c) Con la misma finalidad se incluye la descripción de las glicoproteínas de origen vegetal, tanto de leguminosas como de otras familias, diferenciándolas entre estructurales y no estructurales. Se detallan los tipos de unión hidrato de carbono-proteína que pueden presentar estos compuestos.
 - d) Una descripción de la forma y estructura de las paredes celulares de vegetales superiores, la composición química de las mismas y los métodos empleados en la determinación de la estructura molecular. Se resume el único estudio sistemático sobre la estructura de las paredes celulares, efectuado por Albersheim y col., a fin de ilustrar sobre la complejidad de este tipo de sistemas.

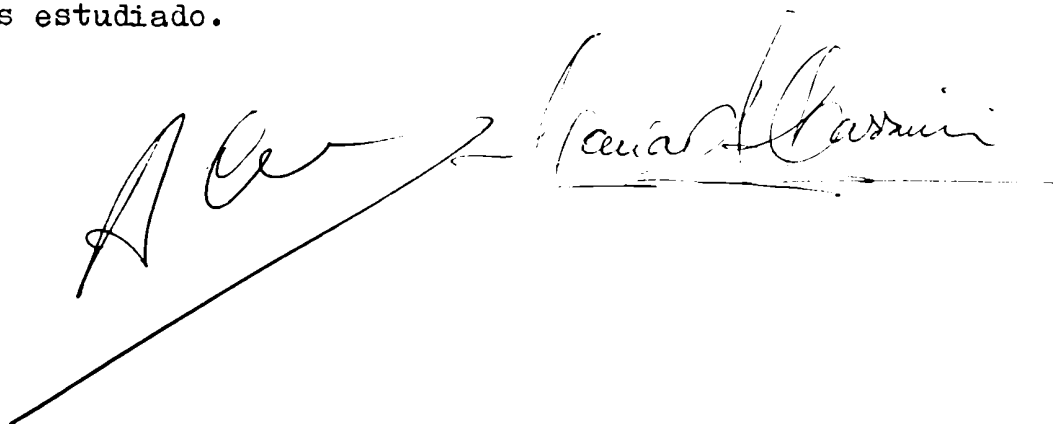
- e) Dado que los principales métodos empleados en la determinación de las estructuras y el tipo de información que éstos proporcionan son ampliamente conocidos, sólo se discutieron en detalle los métodos de extracción, en particular la extracción alcalina, y las modificaciones producidas durante las extracciones. Asimismo se incluye, al final de este trabajo, un Apéndice donde se describen los estudios realizados empleando las técnicas de diálisis, y la discusión sobre los métodos utilizados en la identificación y valoración de los azúcares por cromatografía gas-líquido, en razón de la importancia que para la obtención de los resultados en el análisis de los sistemas de polisacáridos evidencia esta última técnica.
- 3) Las características del estudio realizado y la variedad de datos obtenidos determinaron que, para lograr una mayor claridad en la presentación de los resultados, se hiciera necesario separar la descripción de la interpretación y discusión de los mismos. La descripción abarca los resultados obtenidos en el estudio de las semillas, de los polisacáridos componentes del sistema (galactomananos, "hemicelulosas" y "sustancias pécticas"), de las extracciones cruzadas y de los polisacáridos solubles en solución de urea, y en el estudio detallado de las "hemicelulosas" A, B y C. Para la discusión, los polisacáridos fueron divididos en dos grandes grupos: solubles e insolubles en agua, y sobre estos últimos se acentuó la evaluación y discusión de los resultados obtenidos con las "hemicelulosa" A, B y C. Finalmente, de la integración de los resultados fue posible postular estructuras moleculares tentativas para los principales fragmentos y la naturaleza del enlace polisacárido-proteína, y derivar las conclusiones sobre el estudio del sistema de polisacáridos de la semilla de Gleditsia triacanthos. El resumen de dichos estudios figura a continuación:

Las extracciones efectuadas con los distintos solventes sobre el residuo remanente de agotar el material por extracción acuosa, condujeron a la obtención del mismo producto complejo y las características del mismo derivaron del método de aislamiento empleado. En todos los casos, la hidrólisis dio, en adición con la galactosa y la manosa del galactomanano remanente, la mezcla de los azúcares típicos, principalmente, de las sustancias pécticas (ácido galacturónico, arabinosa y galactosa) junto con menores cantidades de fucosa, xilosa y ácido glucurónico, y los aminoácidos y la glucosamina propios de las proteínas y glicoproteínas de reserva de las leguminosas.

El análisis de las distintas fracciones aisladas, y los estudios efectuados con el objeto de obtener una caracterización más detallada de los fragmentos sobre los productos resultantes de la extracción alcalina, permitieron proponer estructuras tentativas para los polisacáridos componentes del sistema. Los polisacáridos identificados fueron los siguientes: (1) galactomanano, con una estructura básica similar a la de los aislados en las extracciones acuosas pero de menor contenido en galactosa (relación Man:Gal 4); (2) arábano, presente en proporciones importantes en todas las fracciones crudas (fucoarábano); (3) galacturonano, consistente en una cadena lineal de ácido galacturónico que contiene restos arabinofuranosílicos en las cadenas laterales y sustituido también, posiblemente, por unidades de xilosa en O-2 ú O-3; (4) galactano, presente en menores proporciones; (5) xilano, de estructura similar a la de los xilanos hemicelulósicos; y (6) glucano, en muy baja relación. En la Tabla 53 se resumen los resultados obtenidos de estimar semicuantitativamente las proporciones relativas de los polisacáridos en cada fracción (los recuadros muestran los polisacáridos definitorios de cada fracción).

Los resultados indicaron que hay fragmentos estructuralmente bien definidos, mientras que otros aparecerían como suma de fragmentos distintos. Los componentes pueden no estar todos involucrados en la misma estructura (macromolécula) pero existe suficiente evidencia a favor de distintos tipos de entrecruzamiento, que tendrían como eje principal un core de proteína al cual estarían unidas las cadenas de polisacáridos. Estas serían fragmentos esencialmente lineales, en promedio cortos, y estarían unidos entre sí (uniones covalentes y no covalentes), confirmando al sistema total las características de una malla.

- 4) La descripción de las técnicas experimentales utilizadas y el detalle de la puesta a punto de las mismas, en los casos en que fue necesario, junto con su aplicación al análisis del sistema de polisacáridos estudiado.



B I B L I O G R A F I A

1. Adams J. B. (1965a). Biochem. J., 94, 368.
2. Adams J. B. (1965b). Biochem. J., 97, 345.
3. Albersheim P. (1959). Biochem. Biophys. Research Commun., 1, 253.
4. Albersheim P. (1965). En: J. Bonner y J. Varner, eds., "Plant Biochemistry". Academic Press, New York. p. 151.
5. Albersheim P., Neukom H. y Deuel H. (1960). Arch. Biochem. Biophys., 90, 46.
6. Albersheim P., Nevins D. J., English P. D. y Karr A. (1967). Carbohyd. Res., 5, 340.
7. Allen A. K. y Neuberger A. (1973). Biochem. J., 135, 307.
8. Anderson E. (1949). Ind. Eng. Chem., Ind. Ed., 41, 2888.
9. Anderson B., Hoffman P. y Meyer K. (1965). J. Biol. Chem., 240, 156.
10. Andrews P., Hough L. y Jones J. K. N. (1954). J. Chem. Soc., 806.
11. Aspinall G. O. (1970). En: W. Pigman y D. Horton, eds., "The Carbohydrates", Vol. IIB. Academic Press, New York. p. 515.
12. Aspinall G. O. y Fanshawe R. S. (1961). J. Chem. Soc., 4215.
13. Aspinall G. O. y Whyte J. N. C. (1964). J. Chem. Soc., 5058.
14. Aspinall G. O., Greenwood G. T. y Sturgeon R. J. (1961). J. Chem. Soc., 3667.
15. Aspinall G. O., Hunt K. y Morrison I. M. (1966). J. Chem. Soc., 1945.
16. Aspinall G. O., Begbie R., Hamilton A. y Whyte J. N. C. (1967a). J. Chem. Soc., 1065.
17. Aspinall G. O., Cottrell I. W., Egan S. V., Morrison I. M. y Whyte J. N. C. (1967b). J. Chem. Soc., 1071.
18. Aspinall G. O., Hunt K. y Morrison I. M. (1967c). J. Chem. Soc., 1080.
19. Aspinall G. O., Craig J. W. T. y Whyte J. L. (1968). Carbohyd. Res., 7, 442.
20. Bailey R. W. (1971). En: J. B. Harbone, D. Boulter y B. L. Turner, eds., "Chemotaxonomy of the Leguminosae". Academic Press, New York. p. 503.
21. Bailey C. J. y Boulter D. (1970). Eur. J. Biochem., 17, 460.
22. Bailey R. W. y Pickmere S. E. (1975). Phytochemistry, 14, 501.
23. Ballou C. E. (1954). Advan. Carbohyd. Chem., 9, 59.
24. Barker S. A., Foster A. B., Siddiqui I. R. y Stacey M. (1958). Talanta, 1, 216.
25. Barker R. D. J., Derbyshire E., Yarwood A. y Boulter D. (1976). Phytochemistry, 15, 751.

26. Bauer W. D., Talmadge K. W., Keegstra K. y Albersheim P. (1973). Plant Physiol., 51, 174.
27. Belcher R., Fildes J. E. y Nutten A. J. (1955). Analytica Chim. Acta, 13, 16.
28. Bencze W. L. y Schmid K. (1957). Anal. Chem., 29, 1193.
29. Benson A. A., Bassham J. A., Calvin M., Hal A. G., Hirsch H. E., Kawaguchi S., Lynch V. y Tolbert N. E. (1952). J. Biol. Chem., 196, 703.
30. Bhatti T., Chambers R. E. y Clamp J. R. (1970). Biochim. Biophys. Acta, 222, 339.
31. Blake J. D. y Richards G. N. (1970). Aust. J. Chem., 23, 2353.
32. Blake J. D. y Richards G. N. (1971a). Carbohydr. Res., 17, 253.
33. Blake J. D. y Richards G. N. (1971b). Carbohydr. Res., 18, 11.
34. Blake J. D., Murphy P. T. y Richards G. N. (1971). Carbohydr. Res., 16, 49.
35. Blumenkrantz N. y Prockop D. J. (1971). Anal. Biochem., 39, 59.
36. Boulter D. y Derbyshire E. (1971). En: J. B. Harbone, D. Boulter y B. L. Turner, eds., "Chemotaxonomy of the Leguminosae". Academic Press, New York, p. 285.
37. Boundy J. A., Wall J. S., Turner J. E., Woychik J. H. y Dimler R. J. (1967). J. Biol. Chem., 242, 2410.
38. Bourrillon R. y Font J. (1968). Biochim. Biophys. Acta, 154, 28.
39. Burkart A. (1952). "Las Leguminosas Argentinas silvestres y Cultivadas". Acme Agency, Bs. As. p. 185.
40. Burke D., Kaufman P., McNeil M. y Albersheim P. (1974). Plant. Physiol., 54, 109.
41. Callanan M. J., Carrol W. R. y Mitchell E. R. (1957). J. Biol. Chem., 229, 279.
42. Cerezo A. S. (1965). J. Org. Chem., 30, 924.
43. Clamp J. R., Dawson G. y Hough L. (1967). Biochim. Biophys. Acta, 148, 342.
44. Condorelli P. y Chindemi A. (1928), Chem. Abstr., 23, 930.
45. Consden R. y Gordon A. H. (1948). Nature, 162, 180.
46. Costello P. R. y Stone B. A. (1968). Proc. Aust. Biochem. Soc., 43.
47. Courtois J. E. y Le Dizet P. (1963). Bull. Soc. Chim. Biol., 45, 731.
48. Courtois J. E. y Le Dizet P. (1966). Carbohydr. Res., 3, 141.
49. Craig L. C. y King T. P. (1955). J. Am. Chem. Soc., 77, 6620.
50. Craig L. C. y King T. P. (1962). Methods Biochem. Anal., 10, 177.
51. Craig L. C. y Konigsberg W. (1961). J. Phys. Chem., 65, 166.

52. Craig L. C., King T. P. y Stracher A. (1957). J. Am. Chem. Soc., 79, 3729.
53. Chambers R. E. y Clamp J. R. (1971). Biochem. J., 125, 1009.
54. Davis B. J. (1964). Ann. New York Acad. Sci., 121, 404.
55. Dea I. C. M. y Morrison A. (1975). Advan. Carbohyd. Chem. Biochem., 31, 241.
56. Dische Z. (1947). J. Biol. Chem., 167, 189.
57. Dische Z. (1950). J. Biol. Chem., 183, 489.
58. Dische Z. y Rothschild C. (1967). Anal. Biochem., 21, 125.
59. Dougall D. K. y Shimbayashi K. (1960). Plant. Physiol., 35, 396.
60. Dryselius E., Lindberg B. y Theander O. (1957). Acta Chem. Scand., 11, 663.
61. Dryselius E., Lindberg B. y Theander O. (1958). Acta Chem. Scand., 12, 340.
62. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. y Smith F. (1956). Anal. Chem., 28, 350.
63. Dumas-Pregel (1958). "Quantitative organische Mikroanalyse", Pregl-Roth, Springer-Verlag, Wien. p. 91.
64. Earle F. R. y Jones Q. (1962). Econ. Botany, 16, 221.
65. Eegrave E. (1937). Z. Anal. Chem., 110, 22.
66. El Hanafy A. R. S. y Taha M. I. (1963). J. Org. Chem., 28, 1559.
67. English P. D., Maglothlin A., Keegstra K. y Albersheim P. (1972). Plant Physiol., 49, 293.
68. Ericson M. C. y Chrispeels M. J. (1973). Plant Physiol., 52, 98.
69. Fernell W. R. y King H. K. (1953). The Analyst, 78, 80.
70. Fincher G. B., Sawyer W. H. y Stone B. A. (1974). Biochem. J., 139, 535.
71. Fletcher A. P., Marks G. S., Marshall R. D. y Neuberger A. (1963). Biochem. J., 87, 265.
72. Foloh J., Lees M. y Stanley H. S. (1957). J. Biol. Chem., 226, 497.
73. Freudenberg K. (1965). Science, 148, 595.
74. Gaillard B. D. E. (1961). Nature, 191, 1295.
75. Gaillard B. D. E. (1965). Phytochemistry, 4, 631.
76. Gaillard B. D. E. y Bailey R. W. (1966). Nature, 212, 202.
77. Gaillard B. D. E. y Bailey R. W. (1968). Phytochemistry, 7, 2037.
78. Gaillard B. D. E., Thompson N. S. y Morak A. J. (1969). Carbohyd. Res., 11, 509.
79. Galambos J. T. (1967). Anal. Biochem., 19, 119; ib., 19, 133.
80. Goa J. y Strid L. (1960). Chem. Abstr., 54, 13278.
81. Gordon H. T., Thornburg W. y Wernen L. N. (1956). Anal. Chem., 28, 849.

82. Goret M. (1900). Compt. Rend., 131, 60.
83. Gould S. E. B., Rees D. A. y Wight N. J. (1971). Biochem. J., 124, 47.
84. Grant G. T., McNab C., Rees D. A. y Skerrett R. J. (1969). Chem. Commun., 805.
85. Guthrie R. D. (1962). Methods Carbohydr. Chem., 1, 435.
86. Heath M. F. y Northoote D. H. (1971). Biochem. J., 125, 953.
87. Hirst E. L. y Jones J. K. N. (1939). J. Chem. Soc., 452.
88. Hirst E. L. y Jones J. K. N. (1947). J. Chem. Soc., 1221.
89. Hirst E. L., Jones J. K. N. y Walder W. O. (1947). J. Chem. Soc., 1225.
90. Hirst E. L., MacKenzie D. J. y Wylam C. B. (1959). J. Sci. Food Agric., 10, 19.
91. Hochstrasser K. (1961). Hoppe-Seyl. Z., 324, 250.
92. Hochstrasser K. (1963). Hoppe-Seyl. Z., 333, 99.
93. Hough L., Jones J. K. N. y Wachman W. H. J. (1950). J. Chem. Soc., 1702.
94. Hui P. A. y Neukom H. (1964). Tappi, 47, 39.
95. Hulyalkar R. K., Ingle T. R. y Bhide B. V. (1957). Chem. Abstr., 51, 10103.
96. Jaffé W. G. (1962). Acta Cient. Venez., 13, 100.
97. Jaffé W. G. y Hanning K. (1965). Arch. Biochem. Biophys., 109, 80.
98. Jennings A. C., Pusztai A., Synge R. L. M. y Watt W. B. (1968). J. Sci. Food Agric., 19, 203.
99. Johansen P. G., Marshall R. D. y Neuberger A. (1961). Biochem. J., 78, 518.
100. Johnson D. B., Moore W. E. y Zank L. C. (1961). Tappi, 44, 793.
101. Jones T. M. y Albersheim P. (1972). Plant Physiol., 49, 926.
102. Kadkol S. B., Desikachar H. S. R. y Srinivasan M. (1962). Chem. Abstr., 56, 10583.
103. Kawamura S. y Narasaki T. (1958). Bull Agric. Chem. Soc. Japan, 22, 436.
104. Keegstra K., Talmadge K. W., Bauer W. D. y Albersheim P. (1973). Plant Physiol., 51, 188.
105. Khanna S. N. y Gupta P. C. (1967). Phytochemistry, 6, 603.
106. Kim J. H., Shome B., Liav T. H. y Pierce J. G. (1967). Anal. Biochem., 20, 258.
107. King N. J. y Bayley S. T. (1965). J. Exp. Bot., 16, 294.
108. Knee M. (1971). J. Sci. Food Agric., 22, 371.
109. Knee M. (1973). Phytochemistry, 12, 637.
110. Koöiman P. (1960a). Chem. Abstr., 54, 25072.

111. Kooiman P. (1960b). *Rec. Trav. Chim. Pay-Bas*, 79, 675.
112. Kooiman P. (1961). *Rec. Trav. Chim. Pay-Bas*, 80, 849.
113. Koshiyama I. (1966). *Agric. Biol. Chem.*, 30, 646.
114. Koshiyama I. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 370.
115. Kunding W., Neukom H. y Deuel H. (1961). *Helv. Chim. Acta*, 44, 823.
116. Kurth E. F. (1939). *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 11, 203.
117. Lambert M. y Neish A. C. (1950). *Can. J. Res.*, 28B, 83.
118. Lamport D. T. A. (1965). *Advan. Bot. Res.*, 2, 151.
119. Lamport D. T. A. (1967). *Nature*, 216, 1322.
120. Lamport D. T. A. (1969). *Biochemistry*, 8, 1155.
121. Lamport D. T. A. (1970). *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 21, 235.
122. Lamport D. T. A. (1975). *Chem. Abstr.*, 83, 25057.
123. Lamport D. T. A. y Northoote D. H. (1960). *Nature*, 188, 665.
124. Lamport D. T. A., Katona L. y Roerig S. (1973). *Biochem. J.*, 133, 125.
125. Larson E. B. y Smith F. (1955). *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 429.
126. Leach A. A. (1960). *Biochem. J.*, 74, 70.
127. Lee Y. C. y Montgomery R. (1962). *Arch. Biochem. Biophys.*, 97, 9.
128. Lehnhard W. F. y Winzler R. J. (1968). *J. Chromatog.*, 34, 471.
129. Leschziner C. y Cerezo A. S. (1970). *Carbohydr. Res.*, 15, 291.
130. Levvy G. A., Hay A. J., Conchie J. y Strachan I. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, 222, 333.
131. Lew B. y Gortner R. A. (1943). *Arch. Biochem.*, 1, 325.
132. Lis H., Fridman C., Sharon N. y Katchalski E. (1966a). *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 301.
133. Lis H., Sharon N. y Katchalski E. (1966b). *J. Biol. Chem.*, 241, 684.
134. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L. A. y Randall R. J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
135. Ludowieg J. y Dorfman A. (1960). *Biochim. Biophys. Acta*, 38, 212.
136. Lugg J. W. H. (1949). *Advan. Protein Chem.*, 5, 229.
137. MacFadyen D. A. (1945). *J. Biol. Chem.*, 158, 107.
138. Marks G. S., Marshall R. D. y Neuberger A. (1963). *Biochem. J.*, 87, 274.
139. Marshall R. D. y Neuberger A. (1964). *Biochemistry*, 3, 1596.
140. Mazzini M. N. y Cerezo A. S. (1973). *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 61, 183.
141. McBain J. W. y Stuewer R. F. (1936). *J. Phys. Chem.*, 40, 1157.
142. McCleary B. V. y Matheson N. K. (1976). *Phytochemistry*, 15, 43.

143. McCready R. M., Swensen H. A. y Macclay W. D. (1946). Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18, 290.
144. McNeil M., Albersheim P., Taiz L. y Jones R. L. (1975). Plant. Physiol., 55, 64.
145. Merewether J. W. T. (1957). Holzforschung, 11, 65.
146. Miller G. L. y Golder R. H. (1950). Arch. Biochem. Biophys., 29, 420.
147. Millerd A., Simon M. y Stern H. (1971). Plant Physiol., 48, 419.
148. Misaki A. y Kanamaru S. (1968). Agric. Biol. Chem., 32, 432.
149. Moe O. A., Miller S. E. y Iwen M. H. (1947). J. Am. Chem. Soc., 69, 2621.
150. Monro J. A., Bailey R. W. y Penny D. (1972). Phytochemistry, 11, 1597.
151. Monro J. A., Bailey R. W. y Penny D. (1974). Phytochemistry, 13, 375.
152. Monro J. A., Bailey R. W. y Penny D. (1975). Carbohydr. Res., 41, 153.
153. Monro J. A., Bailey R. W. y Penny D. (1976). Phytochemistry, 15, 175.
154. Morimoto J. Y., Unrau I. C. J. y Unrau A. M. (1962). J. Agric. Food Chem., 10, 134.
155. Morrison I. M. (1972a). J. Sci. Food Agric., 23, 455.
156. Morrison I. M. (1972b). J. Sci. Food Agric., 23, 1463.
157. Narasaki T. y Fujimoto K. (1965). Chem. Abstr., 63, 18648.
158. Neish A. C. (1965). En: J. Bonner y J. Varner, eds., "Plant Biochemistry". Academic Press, New York. p. 594.
159. Neukom H. y Deuel H. (1958). Chem. & Ind., 683.
160. Neuman R. E. y Logan M. A. (1950). J. Biol. Chem., 184, 299.
161. Nevins D. J., English P. D. y Albersheim P. (1967). Plant. Physiol., 42, 900.
162. Oades J. M. (1967). J. Chromatog., 28, 246.
163. Oates M. D. G. y Schrager J. (1967). J. Chromatog., 28, 232.
164. O'Dwyer H. H. (1926). Biochem. J., 20, 656.
165. Pang Way C. y Richards G. N. (1971). Aust. J. Chem., 24, 1041.
166. Partridge S. M. (1949). Nature, 164, 443.
167. Price V. E. y Greenstein J. P. (1948). Arch. Biochem., 18, 383.
168. Pridham J. B. (1956). Anal. Chem., 28, 1967.
169. Pusztai A. (1964). Nature, 201, 1328.
170. Pusztai A. (1965a). Biochem. J., 94, 604.
171. Pusztai A. (1965b). Biochem. J., 95, 3 C.
172. Pusztai A. (1966a). Biochem. J., 99, 93.

173. Pusztai A. (1966b). *Biochem. J.*, 101, 379.
174. Pusztai A. y Watt W. B. (1969). *European J. Biochem.*, 10, 523.
175. Pusztai A. y Watt W. B. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 413.
176. Rackis J. J., Anderson R. L., Sasame H. A., Smith A. K. y Van Etten C. H. (1961). *J. Agric. Food Chem.*, 9, 409.
177. Racunsen D. y Foote M. (1971). *Can. J. Bot.*, 49, 2107.
178. Redfield R. R. (1953). *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 344.
179. Reinhold V. N. (1972). *Methods in Enzymology*, 25, Pt. B, 244.
180. Rees D. A. (1969). *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* 24, 267.
181. Rees D. A. y Richardson N. G. (1966). *Biochemistry*, 5, 3099.
182. Rees D. A. y Wight N. J. (1969). *Biochem. J.*, 115, 431.
183. Riqué T. (1960). *Folletos Técnicos Forestales*, N° 4.
184. Riqué T. y Pardo L. L. (1954). *Arg. Rep., Min. Agrío. Ganadería, Pub. Téc.*, N° 19.
185. Roberts R. M. (1970). *Plant Physiol.*, 45, 263.
186. Roberts R. M. y Loewus F. (1966). *Plant. Physiol.*, 41, 1489.
187. Roberts R. M., Connor A. B. y Cetorelli J. J. (1971). *Biochem. J.*, 125, 999.
188. Roberts R. M., Cetorelli J. J., Kirby E. G. y Ericson M. (1972). *Plant Physiol.*, 50, 531.
189. Rogers S. C. Mitchell R. L. y Ritter G. J. (1947). *Anal. Chem.*, 19, 1029.
190. Sawardeker J. S., Sloneker J. H. y Jeanes A. (1965). *Anal. Chem.*, 37, 1602.
191. Schulze E. (1891). *Ber.*, 24, 2277.
192. Selvendran R. R. (1975a). *Phytochemistry*, 14, 1011.
193. Selvendran R. R. (1975b). *Phytochemistry*, 14, 2175.
194. Selvendran R. R., Davies A. M. C. y Tidder E. (1975). *Phytochemistry*, 14, 2169.
195. Siddiqui I. R. y Wood P. J. (1974). *Carbohydr. Res.*, 36, 35.
196. Sinha A. (1960a). *Chem. Abstr.*, 54, 21807.
197. Sinha A. (1960b). *Chem. Abstr.*, 54, 25916.
198. Smith F. y Montgomery R. (1959). "Chemistry of Plants Gums and Mucilages". Reinhold Publising Corp., New York. p. 372.
199. Smith M. M. y Stone B. A. (1973). *Phytochemistry*, 12, 1361.
200. Sowden J. C. (1957). *Advan. Carbohydr. Chem.*, 12, 35.
201. Spackman D. H., Stein W. H. y Moore S. (1958). *Anal. Chem.*, 30, 1190.
202. Sultze R. F. (1957). *Tappi*, 40, 985.
203. Sweeley C. C., Bentley R., Makita M. y Wells W. W. (1963). *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2497.

204. Tadros W. y Kamel M. (1952). J. Chem. Soc., 4532.
205. Takahashi T., Ramachendramurthy P. y Lilner I. E. (1967). Biochim. Biophys. Acta, 133, 123.
206. Talmadge K. W., Keegstra K., Bauer W. D. y Albersheim P. (1973). Plant Physiol., 51, 158.
207. Tanaka K. y Pigman W. (1965). J. Biol. Chem., 240, 1487.
208. Tanaka K., Bertolini M. y Pigman W. (1964). Biochem. Biophys. Research Commun., 16, 404.
209. Tanford C. (1968). Advan. Protein Chem., 23, 121.
210. Tanford C. (1969). Advan. Protein Chem., 24, 1.
211. Timell T. E. (1960). J. Am. Chem. Soc., 82, 5211.
212. Timell T. E. (1964). Advan. Carbohyd. Chem., 19, 247
213. Timell T. E. (1965). Advan. Carbohyd. Chem., 20, 409.
214. Tookey L. y Jones Q. (1965). Econ. Botany, 19, 165.
215. Trevelyan M. E., Procter D. P. y Harrison J. S. (1950). Nature, 166, 444.
216. Unrau A. M. (1964). Can. J. Chem., 42, 916.
217. Unrau A. M. y Smith F. (1957). Chem. & Ind., 330.
218. Uriel J. y Grabar P. (1956). Ann. Inst. Pasteur, 90, 427.
219. Valente B. S. y Albersheim P. (1974). Plant Physiol., 54, 105.
220. Vance D. E. y Sweeley C. C. (1967). J. Lip. Res., 8, 621.
221. Van Etten C. H., Miller R. W., Wolff I. A. y Jones Q. (1961a). J. Agric. Food Chem., 9, 79.
222. Van Etten C. H., Miller R. W., Earle F. R., Wolff I. A. y Jones Q. (1961 b). J. Agric. Food Chem., 9, 433.
223. Vogel T. y Schleiden M. J. (1839). Pogg. Ann. Phys. Chem., 46, 327.
224. Wada S., Pallausch M. J. y Liener I. E. (1958). J. Biol. Chem., 233, 395.
225. Waite R., Johnston M. J. y Armstrong D. G. (1964). J. Agric. Sci., Camb., 62, 391.
226. Waldschmidt-Leitz E. y Hochstrasser K. (1961). Hoppe-Seyl. Z., 324, 243.
227. Warren L. (1959). J. Biol. Chem., 234, 1971.
228. Whistler R. L. y BeMiller J. N. (1958). Advan. Carbohyd. Chem., 13, 289.
229. Whistler R. L. y BeMiller J. N. (1963). Methods Carbohyd. Chem., 3, 21.
230. Whistler R. L. y Gaillard P. D. E. (1961). Arch. Biochem. Biophys., 93, 332.
231. Whistler R. L. y Lauterbach G. E. (1958). Arch. Biochem. Biophys., 77, 62.

232. Whistler R. L. y Richards E. L. (1970). En: W. Pigman y Horton, eds., "The Carbohydrates". Vol. IIA. Academic Press, New York. p. 447.
233. Whistler R. L. y Saarnio J. (1957). J. Am. Chem. Soc., 79, 6055.
234. Whistler R. L., Bachrach J. y Bowman D. R. (1948). Arch. Biochem. Biophys., 19, 25.
235. Wilder B. M. y Albersheim P. (1973). Plant Physiol., 51, 889.
236. Wilson C. M. (1959). Anal. Chem., 31, 1199.
237. Wolf W. J., Sly D. A. y Kwolek W. F. (1966). Cereal Chem., 43, 80.
238. Wolfson M. L. y Kashimura N. (1969). Carbohydr. Res., 11, 151.
239. Worth H. J. G. (1967). Chem. Rev., 67, 465.
240. Wulff G. (1965). J. Chromatog., 18, 285.